

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	メモ* (参考)
C 0 7 C 317/12		C 0 7 C 317/12	
C 0 1 B 31/02	1 0 1	C 0 1 B 31/02	1 0 1 F
C 0 7 C 29/16		C 0 7 C 29/16	
29/32		29/32	
33/18		33/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 134 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平9-531955	(71) 出願人	ハイピリオン カタリシス インターナショナル インコーポレイテッド アメリカ合衆国02138 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, スミス プレース 38
(86) (22) 出願日	平成9年3月5日 (1997.3.5)	(72) 発明者	フィッシャー, アラン アメリカ合衆国02139 マサチューセッツ州ケンブリッジ, アントリム ストリート 80
(85) 翻訳文提出日	平成10年9月7日 (1998.9.7)	(72) 発明者	ホック, ロバート アメリカ合衆国12439 ニューヨーク州ヘンソンビル, アール, アール, 1, ボックス 422
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 7 / 0 3 5 5 3	(74) 代理人	弁理士 浅村 皓 (外3名) 最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 3 2 5 7 1		
(87) 国際公開日	平成9年9月12日 (1997.9.12)		
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 3 7, 2 3 8		
(32) 優先日	平成8年3月6日 (1996.3.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

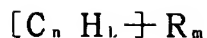
(54) 【発明の名称】 官能化されたナノチューブ

(57) 【要約】

化学的置換によって又は官能性成分の吸着によって官能化されている、グラファイト性ナノチューブ〔管状フラーレン（通常、「バッキーチューブ」と称される）やフィブリルをも包含する〕。より詳しくは、本発明は、化学的成分によって均一又は不均一に置換されている又は特定の環状化合物が吸着されているグラファイト性ナノチューブに関し、また、かかる官能化されたナノチューブが互いに連結して構成する複合体構造に関する。更に、本発明はかかるナノチューブの表面上に官能基を導入する方法に関する。更に、本発明は官能化されたナノチューブの用途に関する。

【特許請求の範囲】

1. 式



〔式中、

炭素原子、 C_n は、5より大きい長さ／直径比と0.5 μ より小さい直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい数であり、

R の各々は同一であって、

SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $R'CHOH$, CHO , CN , $COCl$, ハライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' , SiR'_3 ,

$Si\text{---}(OR')\text{---}, R'_{3-y}$, $Si\text{---}O\text{---}SiR'_2\text{---}OR'$, R'' , Li , AlR'_2 , $Hg\text{---}X$, $TlZ_2Mg\text{---}X$,

から選ばれ、

y は3以下の整数であり、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリール、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

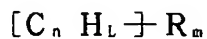
R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、そして

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートである]

の合成物。

2. 式



〔式中、

炭素原子、 C_n は、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性フィブリルの表面炭素であり、前記フィブリル上のグラファイト層の突起はフィブリル直径少なくとも2つ分の距離延びており、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい

数であり、

Rの各々は同一であって、

SO_3H , COOH , NH_2 , OH , $\text{R}'\text{CHOH}$, CHO , CN , COCl , ハ
ライド, COSH , SH , COOR' , SR' , SiR'_3 ,

$\text{Si}(\text{OR}')_y\text{R}'_{3-y}$, $\text{Si}(\text{O-SiR}'_2)_y\text{OR}'$, R'' , Li ,
 AlR'_2 , Hg-X , TlZ_2 および Mg-X ,

から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R'は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリ
ール、またはポリ(アルキルエーテル)であり、

R''はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたは
フルオロアラルキルであり、

Xはハライドであり、そして

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートである]

の合成物。

3. 式



[式中、

炭素原子、 C_n は、フィッシュボーンフィブリルの表面原子であり、

nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、mは0.5nより小さい
数であり、

Rの各々は同一であって、

SO_3H , COOH , NH_2 , OH , $\text{R}'\text{CHOH}$, CHO , CN , COCl , ハ
ライド, COSH , SH , COOR' , SR' , SiR'_3 ,

$\text{Si}(\text{OR}')_y\text{R}'_{3-y}$, $\text{Si}(\text{O-SiR}'_2)_y\text{OR}'$, R'' , Li ,
 AlR'_2 , Hg-X , TlZ_2 および Mg-X ,

から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R'は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリ

ール、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

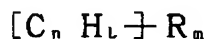
R”はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

Xはハライドであり、そして

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートである]

の合成物。

4. 式



[式中、

炭素原子、C_nは、5より大きい長さ／直径比と0.5μより小さい直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、mは0.5nより小さい数であり、

Rの各々は同一であってもよいし又は異なってもよく、

SO₃H, COOH, NH₂, OH, R'CHOH, CHO, CN, COCl, ハライド, COSH, SH, COOR', SR', SiR'₃,

Si(OR')_{3-y}, Si(O-SiR'₂)₂OR', R'', Li, AlR'₂, Hg-X, TlZ₂およびMg-X, から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R'は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリール、またはポリ（アルキルエーテル）から選ばれ、

R”はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

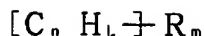
Xはハライドであり、

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、

そして、Rの各々が酸素含有基である場合にはCOOHが存在しないことを条件とする]

の合成物。

5. 式



〔式中、

炭素原子、 C_n は、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性フィブリルの表面炭素であり、前記フィブリル上のグラファイト層の突起はフィブリル直径少なくとも2つ分の距離延びており、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい数であり、

R の各々は同一であってもよいし又は異なってもよく、
 SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $R'CHOH$, CHO , CN , $COCl$, ハ
 ライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' , SiR'_3 ,

$Si(OR')_y$, R'_{3-y} , $Si(O-SiR'_2)_zOR'$, R'' , Li ,
 AlR'_2 , $Hg-X$, TlZ_2 および $Mg-X$,

から選ばれ、

y は3以下の整数であり、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリー
 ル、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたは
 フルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、

そして、 R の各々が酸素含有基である場合には $COOH$ が存在しないことを条
 件とする〕

の合成物。

6. 式



〔式中、

炭素原子、 C_n は、フィッシュボーンフィブリルの表面原子であり、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい

数であり、

Rの各々は同一であってもよいし又は異なってもよく、
 SO_3H , COOH , NH_2 , OH , $\text{R}'\text{CHOH}$, CHO , CN , COCl , ハ
 ライド, COSH , SH , COOR' , SR' , SiR'_3 ,

$\text{Si}(\text{OR}')_y$, $\text{Si}(\text{OR}')_2\text{OR}''$, LiAlR'_2 , Hg-X , TlZ_2 および Mg-X ,

から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R'は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリ
 ール、またはポリ(アルキルエーテル)であり、

R''はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたは
 フルオロアラルキルであり、

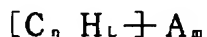
Xはハライドであり、

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、

そして、Rの各々が酸素含有基である場合には COOH が存在しないことを条
 件とする]

の合成物。

7. 式

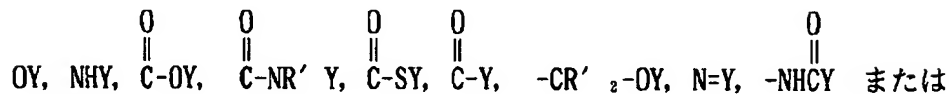


[式中、

炭素原子、 C_n は、5より大きい長さ/直径比と0.1 μ より小さい直径を有
 する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

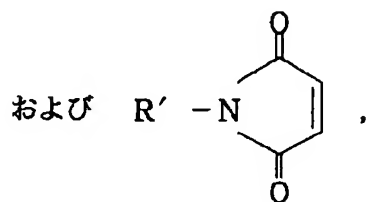
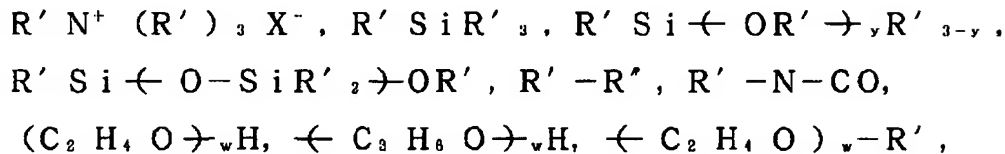
nは整数であり、Lは0.1 nより小さい数であり、mは0.5 nより小さい
 数であり、

Aの各々は



C=Y ,

から選ばれ、

$$R' - OH, R' - N(R')_2, R' - SH, R' - CHO, R' - CN, R' - X,$$


から選ばれ、

y は 3 以下の整数であり、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R² はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

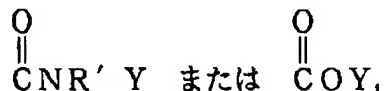
Xはハライドであり、

Zはガルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

wは1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物。

8. $A \nabla^2$



であり、

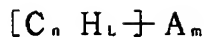
R' が H であり、そして

Yが、リジン、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸およびグルタ

ミン酸からなる群から選ばれたアミノ酸である、

請求項7の合成物。

9. 式

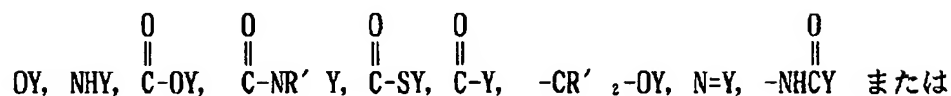


〔式中、

炭素原子、 C_n は、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性フィブリルの表面炭素であり、前記フィブリル上のグラファイト層の突起はフィブリル直径少なくとも2つ分の距離延びており、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい数であり、

A の各々は

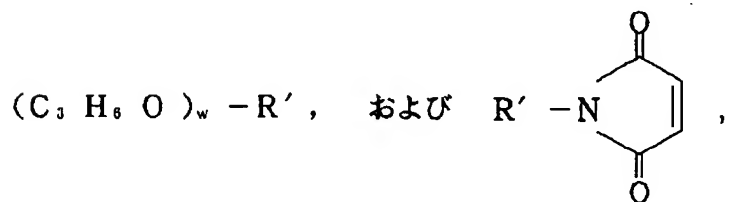
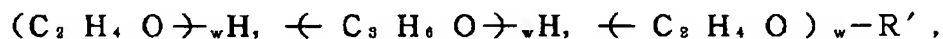
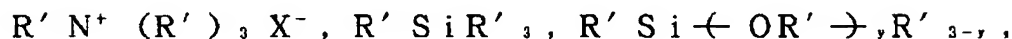


$C=Y$,

から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-N(R')_2$, $R'-SH$, $R'-CHO$, $R'-CN$, $R'-X$,



から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

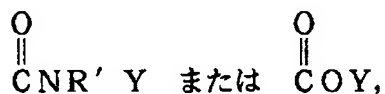
Xはハライドであり、

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

wは1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物。

10. Aが



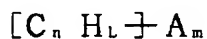
であり、

R' がHであり、そして

Yが、リジン、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選ばれたアミノ酸である、

請求項9の合成物。

11. 式

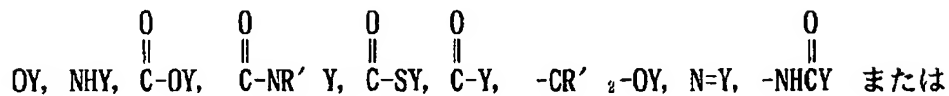


[式中、

炭素原子、C_n、はフィッシュボーンフィブリルの表面原子であり、

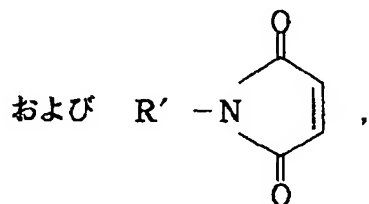
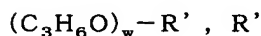
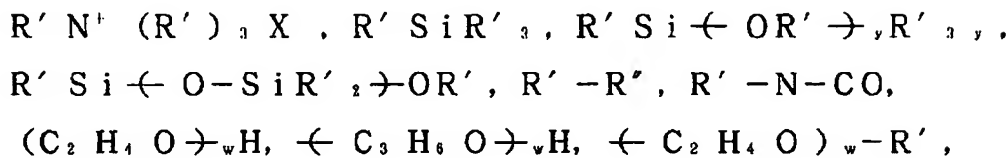
nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、mは0.5nより小さい数であり、

Aの各々は



C=Y,

から選ばれ、

$$R' - OH, R' - N(R')_2, R' - SH, R' - CHO, R' - CN, R' - X,$$


から選ばれ、

y は 3 以下の整数であり、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R² はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

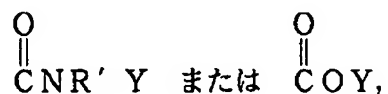
Xはハライドであり、

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

wは1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物。

12. Aが



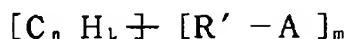
であり、

R' が H であり、そして

Yが、リジン、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選ばれたアミノ酸である、

請求項11の合成物。

13. 式



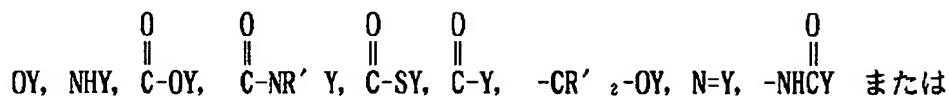
[式中、

炭素原子、 C_n は、5より大きい長さ／直径比と0.5 μ より小さい直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、mは0.5nより小さい数であり、

R' の各々はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリール、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

Aは

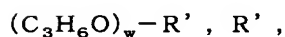
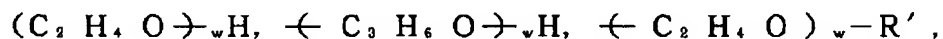
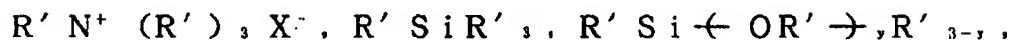


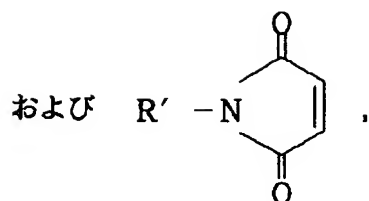
$C=Y$,

から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-N(R')_2$, $R'-SH$, $R'-CHO$, $R'-CN$, $R'-X$,





から選ばれ、

y は 3 以下の整数であり、

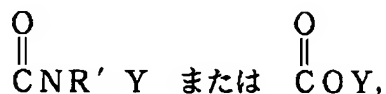
R' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラールキルであり、

X はハライドであり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は 1 より大きくかつ 200 より小さい整数である] の合成物。

14. A が



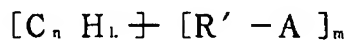
であり、

R' が H であり、そして

Y が、リジン、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選ばれたアミノ酸である、

請求項 13 の合成物。

15. 式



[式中、

炭素原子、C_n は、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性フィブリルの表面炭素であり、前記フィブリル上のグラファイト層の突起はフィブリル直径少なくとも 2 つ分の距離延びており、

n は整数であり、L は 0.1 n より小さい数であり、m は 0.5 n より小さい数であり、

R' の各々はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリール、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

Aは

OY , NHY , $\overset{O}{\parallel}C-OY$, $\overset{O}{\parallel}C-NR'Y$, $\overset{O}{\parallel}C-SY$, $\overset{O}{\parallel}C-Y$, $-CR'_2-OY$, $N=Y$, $-NHCY$ または
 $C=Y$,

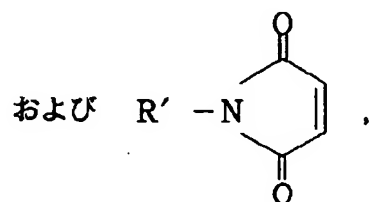
から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、酵素、アミノ酸、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R-NR'_2$, $R'SH$, $R'CHO$, $R'CN$, $R'X$,

$R'N^+(R')_3X$, $R'SiR'_3$, $R'Si\leftarrow OR'\rightarrow R'_3$,
 $R'Si\leftarrow O-SiR'_2\rightarrow OR'$, $R'-R''$, $R'-N-CO$,
 $(C_2H_4O)_wH$, $\leftarrow C_3H_6O\rightarrow_wH$, $\leftarrow C_2H_4O)_w-R'$,

$(C_3H_6O)_w-R'$, R' ,



から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R''はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

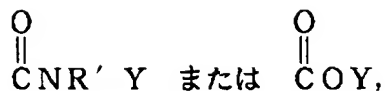
Xはハライドであり、

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

wは1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物。

16. Aが



であり、

R' がHであり、そして

Yが、リジン、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群から選ばれたアミノ酸である、

請求項15の合成物。

17. 式



[式中、

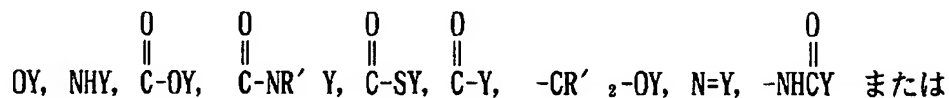
炭素原子、C_nは、フィッシュボーンフィブリルの表面原子であり、

nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、mは0.5nより小さい

数であり、

R' の各々はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリール、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

Aは

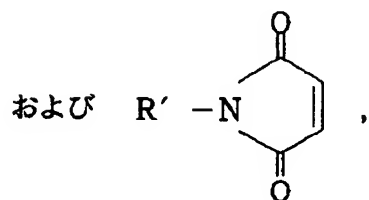
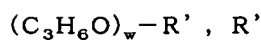
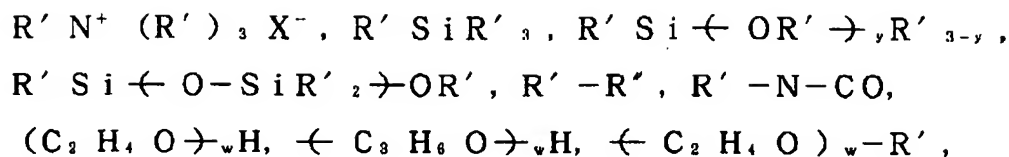


C=Y,

から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

R' -OH, R' -N(R')₂, R' SH, R' CHO, R' CN, R' X,



から選ばれ、

y は 3 以下の整数であり、

R' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロラルキルであり、

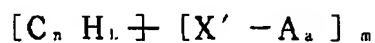
X はハライドであり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は 1 より大きくかつ 200 より小さい整数である]

の合成物。

18. 式

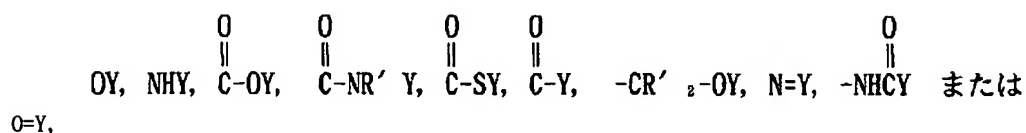


[式中、

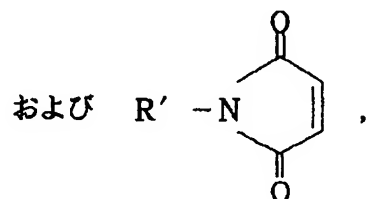
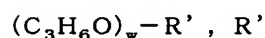
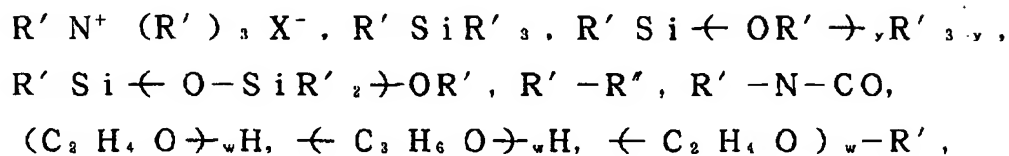
炭素原子、C_n は、5 より大きい長さ／直径比と 0.5 μ より小さい直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、L は 0.1 n より小さい数であり、m は 0.5 n より小さい数であり、a は 10 より小さい整数であり、

A の各々は

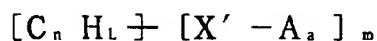


Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$$R' - OH, R' - N(R')_2, R' - SH, R' - CHO, R' - CN, R' - X,$$


R² はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

19. 式

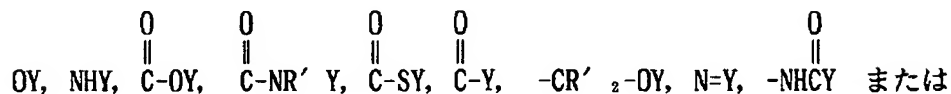


〔式中、

炭素原子、 C_n は、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性フィブリルの表面炭素であり、前記フィブリル上のグラファイト層の突起はフィブリル直径少なくとも2つ分の距離延びており、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい数であり、 a は10より小さい整数であり、

A の各々は

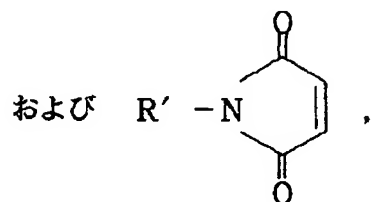
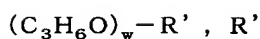
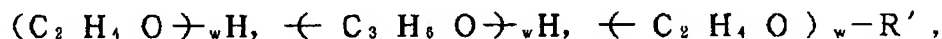
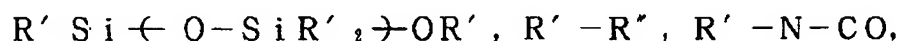
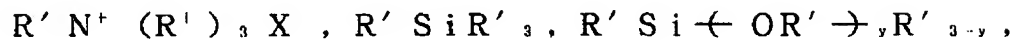


$C=Y$,

から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-N(R')_2$, $R'SH$, $R'CHO$, $R'CN$, $R'X$,



から選ばれ、

y は3以下の整数であり、

R' はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

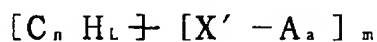
X' は、多核芳香族、ポリヘテロ核芳香族またはメタロポリヘテロ核芳香族成分であり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は 1 より大きくかつ 200 より小さい整数である]

の合成物。

20. 式

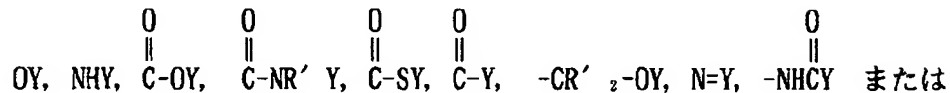


[式中、

炭素原子、C_n は、フィッシュボーンフィブリルの表面原子であり、

n は整数であり、L は 0.1 n より小さい数であり、m は 0.5 n より小さい数であり、a は 10 より小さい整数であり、

A の各々は



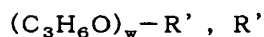
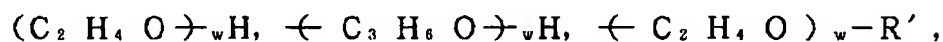
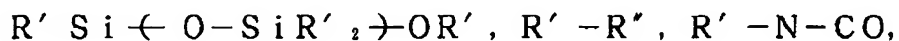
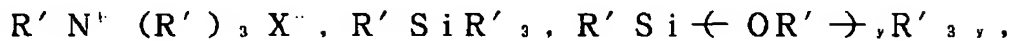
C=Y,

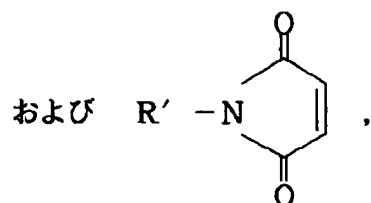
から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体

の適切な官能基であり、又は

R' -OH, R' -N(R')₂, R' SH, R' CHO, R' CN, R' X,





から選ばれ、

y は 3 以下の整数であり、

R' はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリー
ルであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたは
フルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

X' は、多核芳香族、ポリヘテロ核芳香族またはメタロポリヘテロ核芳香族成
分であり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は 1 より大きくかつ 200 より小さい整数である]

の合成物。

21. 式



[式中、

炭素原子、C_n は、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素
であり、

n は整数であり、L は 0.1 n より小さい数であり、m は 0.5 n より小さい
数であり、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロア
リール、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたは
フルオロアラルキルである]

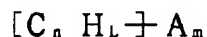
の合成物を生成する方法であって、

ラジカル開始剤の存在下で表面炭素と式 $R'CH_2OH$ を有する化合物とを、

式 $[C_nH_L-CH(R')OH]_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させる工程を含む、前記方法。

22. 前記ラジカル開始剤が過酸化ベンゾイルである請求項21の方法。

23. 式

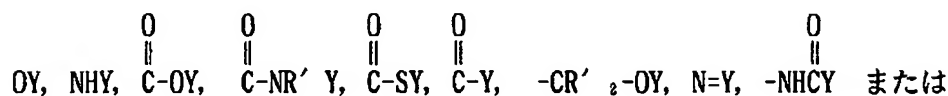


〔式中、

炭素原子、 C_n は、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい数であり、

A の各々は

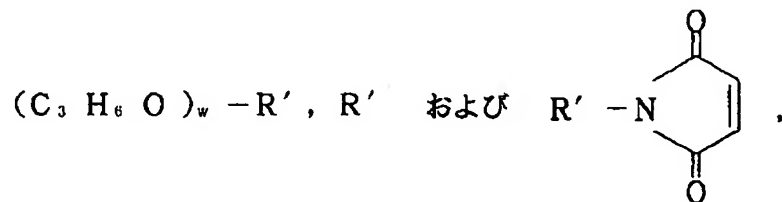
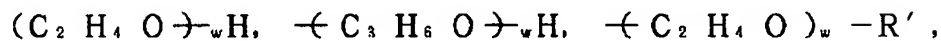


$C=Y$,

から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-N(R')_2$, $R'-SH$, $R'-CHO$, $R'-CN$, $R'-X$,
 $R'-SiR'_3$, $R'-N^+(R')_3X^-$, $R'-R''$, $R'-N-CO$,



から選ばれ、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R”はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアララルキルであり、
 Xはハライドであり、
 Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして
 wは1より大きくかつ200より小さい整数である]
 の合成物を生成する方法であって、

(a) 表面炭素と少なくとも一つの適切な試薬とを、式 $[C_n H_L \text{---} R_m]$ (式中、Rの各々は同一であって、
 SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $CH(R')OH$, CHO , CN ,
 $COCl$, ハライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' ,

SiR'_3 , $Si(OR')_3$, R'' , Li , AlR'_2 , $Hg-X$,
 TlZ_2 および $Mg-X$,

から選ばれ、そしてyは3以下の整数である)を有する置換ナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させ;そして

(b) 置換ナノチューブ $[C_n H_L \text{---} R_m]$ と少なくとも一つの適切な試薬とを、

式 $[C_n H_L \text{---} A_m]$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させる

諸工程を含む、前記方法。

24. 式

$[C_n H_L \text{---} A_m]$

(式中、

炭素原子、 C_n は、5より大きい長さ/直径比と0.1 μ より小さい直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

nは整数であり、Lは0.1 nより小さい数であり、mは0.5 nより小さい数であり、

Aの各々は

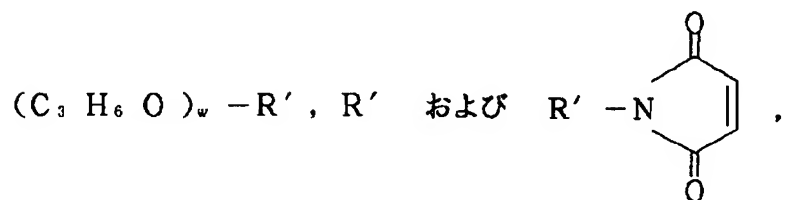
OY , NHY , $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OY}$, $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NR}'\text{Y}$, $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{SY}$, $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Y}$, $-\text{CR}'_2-\text{OY}$, $\text{N}=\text{Y}$, $-\text{NHCY}$ または $\text{C}=\text{Y}$,

から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$\text{R}'-\text{OH}$, $\text{R}'-\text{N}(\text{R}')_2$, $\text{R}'\text{SH}$, $\text{R}'\text{CHO}$, $\text{R}'\text{CN}$, $\text{R}'\text{X}$, $\text{R}'\text{SiR}'_3$, $\text{R}'-\text{N}^+(\text{R}')_3\text{X}^-$, $\text{R}'-\text{R}''$, $\text{R}'-\text{N}-\text{CO}$,

$(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_w\text{H}$, $-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_w\text{H}$, $-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_w-\text{R}'$,



から選ばれ、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

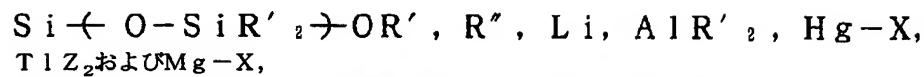
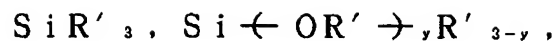
Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物を生成する方法であって、

(a) 表面炭素と少なくとも一つの適切な試薬とを、式 $[\text{C}_n\text{H}_L\text{R}_m]$ (式中、 R の各々は

SO_3H , COOH , NH_2 , OH , $\text{CH}(\text{R}')\text{OH}$, CHO , CN , COCl , ハライド, COSH , SH , COOR' , SR' ,



から選ばれ、そして y は 3 以下の整数である) を有する置換ナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させ;そして

(b) 置換ナノチューブ $[\text{C}_n \text{H}_L \rightarrow \text{R}_m$ と少なくとも一つの適切な試薬とを、

式 $[\text{C}_n \text{H}_L \rightarrow \text{A}_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させる

諸工程を含む、前記方法。

25. 式

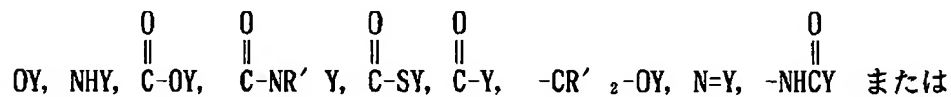


[式中、

炭素原子、 C_n は、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、 L は 0. $1n$ より小さい数であり、 m は 0. $5n$ より小さい数であり、

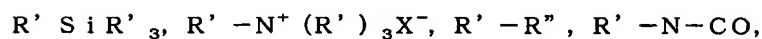
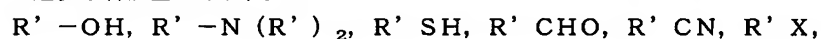
A の各々は

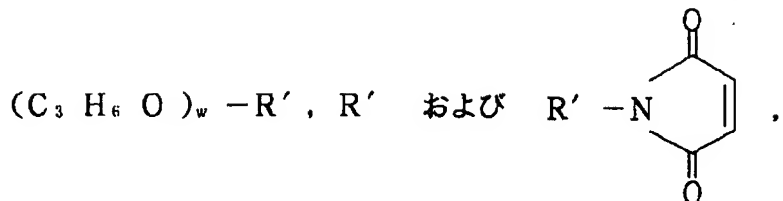
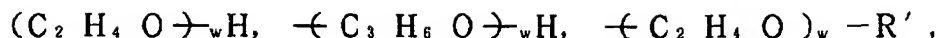


C=Y ,

から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は





から選ばれ、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は 1 より大きくかつ 200 より小さい整数である]

の合成物を生成する方法であって、

(a) 表面炭素と少なくとも一つの適切な試薬とを、式 $[\text{C}_n\text{H}_l]\text{-R}_m$ [式中、R の各々は

SO_3H , COOH , NH_2 , OH , CH(R')OH , CHO , CN , COCI , ハライド, COSH , SH , COOR' , SR' ,

SiR'_3 , $\text{Si(OR')}_y\text{R'}_{3-y}$,

$\text{Si(O-SiR'}_2\text{)}_y\text{OR'}$, R'' , Li , AlR'_2 , Hg-X , TlZ_2 および Mg-X ,

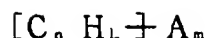
から選ばれ、そして y は 3 以下の整数である] を有する置換ナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させ; そして

(b) 置換ナノチューブ $[\text{C}_n\text{H}_l]\text{-R}_m$ と少なくとも一つの適切な試薬とを、

式 $[\text{C}_n\text{H}_l]\text{-A}_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させる

諸工程を含む、前記方法。

26. 式

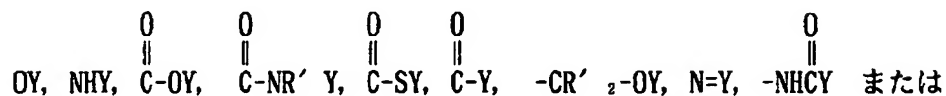


〔式中、

炭素原子、 C_n は、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、 L は $0.1n$ より小さい数であり、 m は $0.5n$ より小さい数であり、

A の各々は

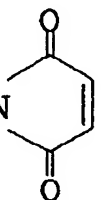
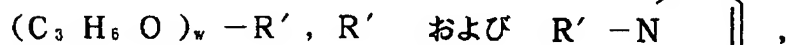
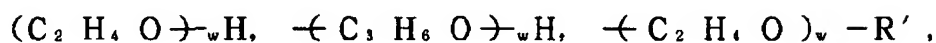


$C=Y$,

から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-N(R')_2$, $R'-SH$, $R'-CHO$, $R'-CN$, $R'-X$,
 $R'-SiR'_3$, $R'-N^+(R')_3X^-$, $R'-R''$, $R'-N-CO$,



から選ばれ、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物を生成する方法であって、

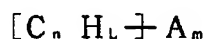
置換ナノチューブ $[C_n H_L]_n R_m$ と少なくとも一つの適切な試薬とを、式

$[C_n H_L]_n A_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で反応させる工程を含み、Rの各々は同一であって、

SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $CH(R')OH$, CHO , CN , $COCl$,
ハライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' , SiR'_3 ,

$Si(OR')_3$, $Si(OR')_2R'$, $Si(OR')_2R''$, $LiAlR'_2$, $Hg-X$, TlZ_2 および $Mg-X$,
から選ばれ、そしてyは3以下の整数である、前記方法。

27. 式

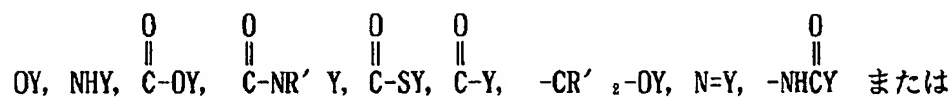


[式中、

炭素原子、 C_n は、5より大きい長さ/直径比と0.1 μ より小さい直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

nは整数であり、Lは0.1 nより小さい数であり、mは0.5 nより小さい数であり、

Aの各々は

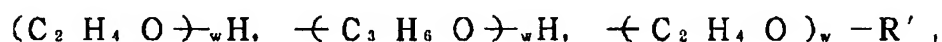


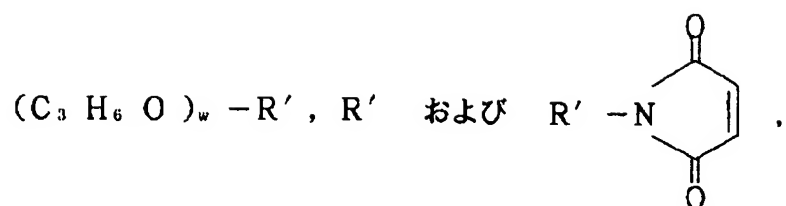
$C=Y$,

から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-N(R')_2$, $R'SH$, $R'CHO$, $R'CN$, $R'X$,
 $R'SiR'_3$, $R'-N^+(R')_3X^-$, $R'-R''$, $R'-N-CO$,





から選ばれ、

R' は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

Z はカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

w は 1 より大きくかつ 200 より小さい整数である]

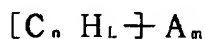
の合成物を生成する方法であって、

置換ナノチューブ $[C_nH_L]_m R_m$ と少なくとも一つの適切な試薬とを、式

$[C_nH_L]_m A_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で反応させる工程を含み、 R の各々は SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $CH(R')OH$, CHO , CN , $COCl$, ハライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' , SiR'_3 ,

$Si(OR')_3$, R'_{3-y} , $Si(O-SiR'_2)_yOR'$, R'' , Li , AlR'_2 , $Hg-X$, TlZ_2 および $Mg-X$, から選ばれ、そして y は 3 以下の整数である、前記方法。

28. 式



[式中、

炭素原子、 C_n は、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、 L は 0.1 n より小さい数であり、 m は 0.5 n より小さい数であり、

A の各々は

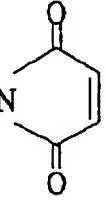
$\text{OY, NHY, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-OY, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-NR' Y, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-SY, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-Y, } -\text{CR'}_2-\text{OY, N=Y, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{NHCY}$ または
 C=Y,

から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$\text{R' -OH, R' -N(R')}_2, \text{R' SH, R' CHO, R' CN, R' X,}$
 $\text{R' SiR'}_3, \text{R' -N}^+(\text{R'})_3\text{X}^-, \text{R' -R''}, \text{R' -N-CO,}$

$(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_w\text{H, } \text{-(C}_3\text{H}_5\text{O)}_w\text{H, } \text{-(C}_2\text{H}_4\text{O)}_w\text{-R'},$

$(\text{C}_3\text{H}_5\text{O})_w\text{-R'}, \text{R'}$ および R' -N

,

から選ばれ、

R' はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

Xはハライドであり、

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

wは1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物を生成する方法であって、

置換ナノチューブ $[\text{C}_n\text{H}_l]_m\text{R}_m$ と少なくとも一つの適切な試薬とを、式

$[\text{C}_n\text{H}_l]_m\text{A}_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で反応させる工程を含み、Rの各々は

$\text{SO}_3\text{H, COOH, NH}_2, \text{OH, CH(R')OH, CHO, CN, COCl}$
, ハライド, $\text{COSH, SH, COOR'}, \text{SR'}, \text{SiR'}_3,$

29. 式



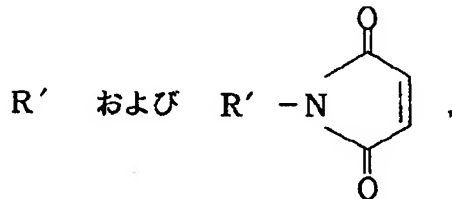
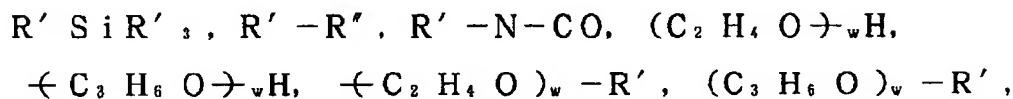
n は整数であり、 L は $0.1n$ より小さい数であり、 m は $0.5n$ より小さい数であり、

Xはハライドであり、

$$\text{OY, NHY, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-OY, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-NR' Y, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-SY, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-Y, } -\text{CR'}_2\text{-OY, N=Y, } \overset{\text{O}}{\parallel}\text{NHCY} \text{ または}$$
$$C=Y,$$

から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$$R' - OH, R' - NH_2, R' - SH, R' - CHO, R' - CN, R' - X,$$


から選ばれ、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、そして

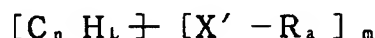
Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートである]の合成物を生成する方法であって、

式 $[C_n H_L]_n [R' - R]_m$ を有する置換ナノチューブと少なくとも一つの

適切な試薬とを、式 $[C_n H_L]_n [R' - A]_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で反応させる工程を含み、Rの各々は SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $CH(R')OH$, CHO , CN , $COCl$, ハライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' , SiR'_3 ,

$Si(OR')_y R'_{3-y}$, $Si(O-SiR'_2)_y OR'$, R'' , Li , AlR'_2 , $Hg-X$, TlZ_2 および $Mg-X$, から選ばれ、そしてyは3以下の整数である、前記方法。

30. 式



[式中、

炭素原子、 C_n は、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、mは0.5nより小さい数であり、aはゼロ又は10より小さい整数であり、

Rの各々は

SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $CH(R')OH$, CHO , CN , $COCl$, ハライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' , SiR'_3 ,

$Si(OR')_y R'_{3-y}$, $Si(O-SiR'_2)_y OR'$, R'' , Li , AlR'_2 , $Hg-X$, TlZ_2 および $Mg-X$,

から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R' はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

Xはハライドであり、

X' は、多核芳香族、ポリヘテロ核芳香族またはメタロポリヘテロ核芳香族成分であり、

R" はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、そして

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートである]

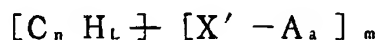
の合成物を生成する方法であって、

グラファイト性ナノチューブの表面上に少なくとも一つの適切なマクロ環状化

合物を、式 $[C_n H_L]_n [X' - R_a]_m$ を有する官能化されたナノチューブを

生成するのに十分な条件下で、吸着させる工程を含む、前記方法。

31. 式

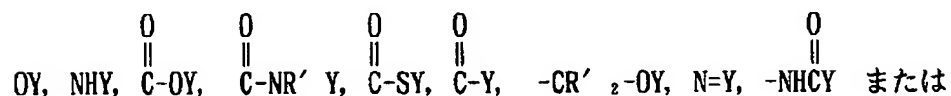


[式中、

炭素原子、C_nは、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

nは整数であり、Lは0. 1 nより小さい数であり、mは0. 5 nより小さい数であり、aは1 0より小さい整数であり、

Aの各々は

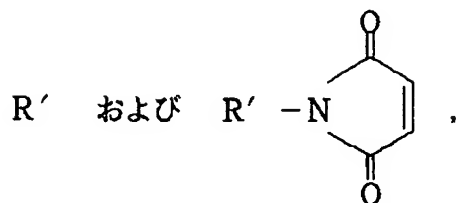


C=Y,

から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

R' -OH, R' -NH₂, R' SH, R' CHO, R' CN, R' X,

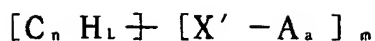


(a) グラファイト性ナノチューブの表面上に少なくとも一つの適切なマクロ

-32-

諸工程を含む、前記方法。

32. 式

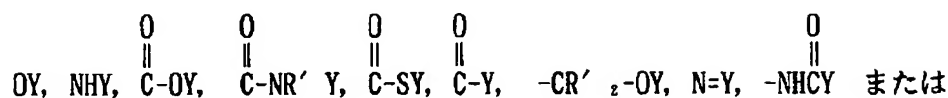


〔式中、

炭素原子、 C_n は、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、 m は0.5 n より小さい数であり、 a は10より小さい整数であり、

A の各々は

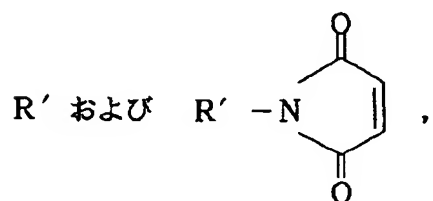
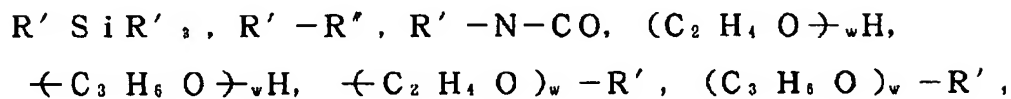


$C=Y$,

から選ばれ、

Y は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-NH_2$, $R'-SH$, $R'-CHO$, $R'-CN$, $R'-X$,



から選ばれ、

R' はアルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキルまたはシクロアリールであり、

R'' はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキルまたはフルオロアラルキルであり、

X はハライドであり、

X' は、多核芳香族、ポリヘテロ核芳香族またはメタロポリヘテロ核芳香族成分であり、

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートであり、そして

wは1より大きくかつ200より小さい整数である]

の合成物を生成する方法であって、

置換ナノチューブ $[C_n H_L]_m [X' - R_a]_m$ と少なくとも一つの適切な試

薬とを、式 $[C_n H_L]_m [X' - A_a]_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させる工程を含み、Rの各々が

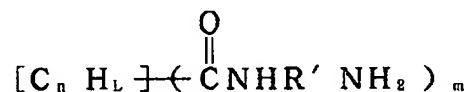
SO₃H, COOH, NH₂, OH, CHO, CN, COCl, ハライド, CO

SH, SH, COOR', SR', SiR'₃, Si(OR')_yR'_{3-y},

Si(O-SiR'₂)₂OR', R'', Li, AlR'₂, Hg-X, TlZ₂およびMg-X,

から選ばれ、そしてyは3以下の整数である、前記方法。

33. 式



(式中、

炭素原子、C_nは、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、そしてmは0.5nより小さい数であり、

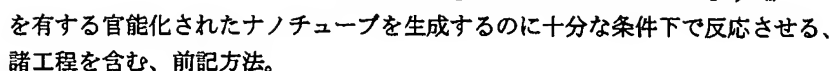
R' はアルキル、アリール、シクロアルキルまたはシクロアリールである)

の合成物を生成する方法であって、

表面炭素と少なくとも一つの適切な試薬とを、式 $[C_n H_L]_m (COOH)_m$ を有する官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、反応させ;

そして

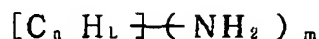
その官能化されたナノチューブと、アミノ基を2つ又はそれ以上有する化合物との、式



-35-

35. R_m が $-OH$ であり、そして酵素がチトクロムP 4 5 0酵素又はペルオキシダーゼである、請求項34の方法。

36. 式



(式中、

炭素原子、 C_n は、実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素であり、

n は整数であり、 L は0.1 n より小さい数であり、そして m は0.5 n より小さい数である)

の合成物を生成する方法であって、

表面炭素を硝酸及び硫酸と反応させて硝酸化ナノチューブを生成し；そして

硝酸化ナノチューブを還元して $[C_n H_L] \text{---} (NH_2)_m$ を生成する諸工程を含む、前記方法。

37. カーボンナノチューブを、該カーボンナノチューブの表面上に官能基を均一に置換することが可能な反応体の有効量と接触させることを含む、カーボンナノチューブの表面を官能基によって均一に置換する方法。

38. 反応体がフタロシアニンである、請求項37の方法。

39. 反応体がニッケル(II)フタロシアニンテトラスルホン酸(テトラナトリウム塩)または1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25-オクタプトキシー29H, 31H-フタロシアニンである、請求項38の方法。

40. カーボンナノチューブを、該カーボンナノチューブの表面上に官能基を置換するための反応体の有効量と接触させることを含む方法によって製造された表面修飾カーボンナノチューブ。

41. 反応体がフタロシアニンである、請求項40の表面修飾カーボンナノチューブ。

42. 反応体がニッケル(II)フタロシアニンテトラスルホン酸(テトラナトリウム塩)または1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25-オクタプトキシー29H, 31H-フタロシアニンである、請求項42の表面修飾カーボンナノチューブ。

43. NHSエステル基を担持するナノチューブとタンパク質とを、NHSエステルとタンパク質のアミン基との間に共有結合を形成するのに十分な条件下で、接触させる工程を含む、ナノチューブにタンパク質を連結させる方法。
44. 官能化されたナノチューブを含む電極。
45. 電極が多孔性フロースルー電極である、請求項44の電極。
46. 官能化されたナノチューブがフタロシアニン置換ナノチューブである請求項45の電極。
47. 官能化されたナノチューブの網状構造の多重からなる多孔性材料であって、前記の官能化されたナノチューブの網状構造は少なくとも1つのリンカー成分によって官能基で連結されている少なくとも2つの官能性フィブリルからなり、前記リンカー成分が二官能性または多官能性どちらかである、前記多孔性材料。
48. 試料から対象溶質を分離する方法であって、
官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、グラファイト性ナノチューブの表面炭素を少なくとも一つの適切な試薬によって物理的又は化学的に修飾し；
官能化されたナノチューブ上に、対象溶質と結合可能な基質を固定化し；そして
官能化されたナノチューブ上に固定化された基質に対象溶質が結合するのに十分な条件下で、置換ナノチューブを対象溶質含有画分に曝す
諸工程を含む、前記方法。
49. 対象溶質がタンパク質である、請求項48の方法。
50. 官能化されたナノチューブを回収する工程を更に含む、請求項49の方法。
51. 官能化されたナノチューブが多孔性マットの形態にある、請求項48の方法。
52. 官能化されたナノチューブが充填カラムの形態にある、請求項48の方法。
53. 結合が可逆的である、請求項48の方法。
54. 結合がイオン性相互作用である、請求項48の方法。

55. 結合が疎水性相互作用である、請求項48の方法。
56. 結合が特異分子認識を介してである、請求項48の方法。

57. 官能化されたナノチューブの複数と連結している 25μ より小さい直径を有する本質的に球形のビーズを含むポリマービーズ。

58. ビーズが磁性である、請求項57のポリマービーズ。

59. 少なくとも一つの反応体が少なくとも一つの生成物に転化される反応を触媒する方法であって、

官能化されたナノチューブを生成するのに十分な条件下で、グラファイト性ナノチューブの表面炭素を少なくとも一つの適切な試薬によって物理的又は化学的に修飾し；

官能化されたナノチューブ上に、反応を触媒できる生体触媒を固定化し；そして

官能化されたナノチューブと反応体（単数または複数）とを、反応体（単数または複数）が生成物（単数または複数）に転化するのに十分な条件下で、接触させる

諸工程を含む、前記方法。

60. 官能化されたナノチューブを、反応が完了した後に回収する工程を更に含む、請求項59の方法。

61. 官能化されたナノチューブが多孔性マットの形態にある、請求項59の方法。

62. 官能化されたナノチューブが充填カラムの形態にある、請求項59の方法。

63. ペプチドの末端アミノ基を可逆的リンカーを介してナノチューブに結合させる工程を含む、ペプチドを合成する方法。

64. リンカーが4-（ヒドロキシメチル）フェノキシ酢酸である、請求項63の方法。

【発明の詳細な説明】

官能化されたナノチューブ 関連出願のクロス・リファレンス

本願は1994年12月8日出願された米国出願第08/352,400号の一部継続出願であり、原出願の内容は本願明細書中に組み入れられる。

発明の分野

広くは、本発明は化学的置換によって又は官能性成分の吸着によって官能化されているグラファイト性ナノチューブに関し、管状フラーレン（通常、「バッキーチューブ」と称する）やフィブリルをも包含する。より詳しくは、本発明は、化学的成分によって均一に又は不均一に置換されている又は特定の環式化合物が吸着されているグラファイト性ナノチューブに関する、及びかかる官能化されたフィブリルが互いに連結されて成る複合体構造(complex structure)に関する。本発明はまた、かかるフィブリルの表面に官能基を導入する方法に関する。

発明の背景

本発明はしばしば蒸着成長カーボンファイバー (vapor grown carbon fiber) と称されるサブミクロンのグラファイト性フィブリルの分野に属する。カーボンフィブリルは、直径が1.0 μ より小さい、好ましくは0.5 μ より小さい、更により好ましくは0.2 μ より小さい、パーミキュラー カーボン デポジット (vermicular carbon deposit)である。それらは多様な形態で存在するが、様々な炭素含有気体の金属表面での接触分解を通して製造される。かかるパーミキュラー カーボン デポジットは電子顕微鏡の出現以来殆ど観察されている。十分に早い時期の調査及び資料は、Baker and Harris, Chemistry and Physics of Carbon, Waker and Thrower ed., Vol. 14, 1978, p. 83に見いだされ、それは本願明細書中に組み入れられる。また、Rodriguez, N., J. Mater. Research, Vol. 8, p. 3233 (1993)を参照、それも本願明細書中に組み入れられる。

1976年に、遠藤ら (Obelin, A., and Endo, M., J. of Crystal Growth,

Vol. 32 (1976), pp. 335-349参照、それは本願明細書中に組み

入れられる) はかかるカーボンフィブリルの成長の基本的メカニズムを解明した。炭化水素含有気体の存在下では炭素の中に過飽和するようになる金属触媒粒子に由来することがわかった。円筒状の秩序化されたグラファイトコアが押し出され、それは遠藤らによれば熱分解付着グラファイト (pyrolytically deposited graphite) の外層で直ちに被覆されてしまう。熱分解オーバーコートを有するこれらフィブリルは直径が 0.1μ を越し、より一般的には $0.2\sim 0.5\mu$ である。

1983年には、テナント(Tennent)の米国特許第4,663,230号(これは本願明細書中に組み入れられる)は熱分解炭素によって汚染されていない円筒状の秩序化されたグラファイトコアを成長させることに成功した。従って、テナントの発明はより小さい直径の、代表的には $35\sim 700$ オングストローム($0.0035\sim 0.070\mu$)のフィブリルの入手及び「成長したとき(asgrown)」秩序化されているグラファイト表面の入手を提供した。しかし、熱分解炭素の外層をもたないけれども、もっと完全でない構造のフィブリル炭素も成長した。

本願における官能化されたフィブリル、バッキーチューブ及びナノチューブは補強材として市販されている連続カーボンファイバーとは区別される。アスペクト比が望ましいことに大きいが限定されることを回避できないフィブリルとは対照的に、連続カーボンファイバーはアスペクト比(L/D)が少なくとも 10^4 であり、しばしば 10^6 以上である。また、連続ファイバーの直径はフィブリルのそれよりもはるかに大きく、常に、 $>1.0\mu$ であり、代表的には、 $5\sim 7\mu$ である。

連続カーボンファイバーは、有機前駆体ファイバー、通常、ナイロン、ポリアクリロニトリル(PAN)及びピッチ、の熱分解によって製造される。従って、それらはその構造の内部にヘテロ原子を包含しているであろう。「製造されたとき(as made)」連続のカーボンファイバーのグラファイト特性は多様である、しかし、それらのファイバーは後でグラファイト化工程を受けてもよい。存在するならばグラファイト平面のグラファイト化度、配向度および結晶化度の相違、へ

テロ原子の存在の可能性、および更には基質直径の絶対的相違は、連続ファイバーによる経験はナノファイバー化学の予想に役立たない。

テナントの米国特許第4, 663, 230号には、連続の熱的カーボン外被を含有しないで、フィブリル軸に実質的に平行な多数のグラファイト外層を有するカーボンフィブリルが記載されている。たとえば、それらは、グラファイトの湾曲層の接線に対して垂直である（すなわち、それらの円筒軸に対して実質的に垂直である）c軸を有するものとして特徴付けられるであろう。それらは一般的には0.1 μ 以下の直径と少なくとも5の長さ／直径比を有する。望ましくは、それらは、連続の熱的カーボン外被、即ち、それらを製造するのに使用した気体供給材料の熱分解からもたらされる熱分解付着炭素、を実質的に含有しない。

テナントの米国特許第5, 171, 560号（これは本願明細書中に組み入れられる）には、熱的外被を含有せずに、フィブリル軸に実質的に平行なグラファイト層を有し前記フィブリル軸上の前記層の突起がフィブリル直径少なくとも2つ分の距離延びているカーボンフィブリルが記載されている。代表的には、かかるフィブリルは実質的に一定の直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブであり、それはそのc軸がその円筒軸に対して実質的に垂直であるところの円筒状のグラファイトのシートからなる。それらは熱分解付着炭素を実質的に含有しないし、0.1 μ より小さい直径と5より大きい長さ／直径比を有する。これらフィブリルは本発明においても第一に関心がある。

カーボンフィブリル集合体の生成に関する更なる詳細は、1988年1月28日出願のスナイダー（Snyder）らの米国特許出願第149, 573号、及び1989年1月28日出願のPCT出願US89/00322号（「カーボンフィブリル」）WO89/07163、及び1989年9月28日出願のモイ（Moy）らの米国特許出願第413, 837号、及び1990年9月27日出願のPCT出願第US90/05498号（「フィブリル集合体及びその製法」）WO91/05089、の開示の中に見いだされる。これらはいずれも本発明と同じ譲受人に対して譲渡されており、いずれも本願明細書中に組み入れられる。

1992年5月22日出願のモイらの米国特許出願第07/887, 307号（これは本願明細書中に組み入れられる）には、（走査電子顕微鏡検査法によ

て測定したときの) 様々な巨視的形態を有する集合体として製造されたフィブリルが記載されており、そこでは、それらは鳥の巣 (bird nest) (「BN」) に似ているフィブリルの絡み合ったボールを形成するように互いに無作為に絡み合っている; 又は、実質的に同じ相対整列を有し梳毛糸 (combed yarn) (「CY」) の外観を有する僅かに曲がった又はねじれたカーボンフィブリルに対して真っ直ぐな束からなる集合体として存在する、例えば、各フィブリルの長軸は (個々の曲がり又はねじれにもかかわらず) 束の中の取り囲んでいるフィブリルのそれと同じ方向に延びている; 又は、「オープン ネット (open net) 」 (「ON」) 構造を形成するように互いにゆるく絡み合っている僅かに曲がった又はねじれたフィブリルに対して真っ直ぐに構成されている集合体として存在する。オープンネット構造においてはフィブリルの絡み合いの度合いは、(個々のフィブリルが実質的に同じ相対整列を有する) 梳毛糸的集合体において観察されるものよりも大きい、鳥の巣のそれよりも少ない。CY集合体およびCN集合体はBNよりも容易に分散され、そのことはそれらをして、構造全体に一樣な性質が望まれる複合体の製造に有効ならしめる。

フィブリル軸上のグラファイト層の突起がフィブリル直径2つ分より小さい距離延びている場合には、グラファイト性ナノチューブの断面における炭素平面はヘリングボーン (herring bone) 外観をおびる。これらをフィッシュボーン フィブリルと称する。ギアス (Geus) の米国特許第4, 855, 091号 (これは本願明細書中に組み入れられる) は、熱分解外被を実質的に含有しないフィッシュボーン フィブリルの製造手順を提供している。これらフィブリルも本発明の実施に有効である。

上記の触媒作用で成長したフィブリルに類似する形態を有するカーボンナノチューブは高温の炭素アークで成長した (Iijima, Nature 354, 56, 1991)。今では、これらアーク成長ナノチューブはテナントの触媒成長フィブリルと同じ形態を有することが一般に受け入れられている (Weaver, Science 265 1994)。アーク成長したカーボン ナノチューブも本発明に有効である。

1989年5月31日出願されたマッカーシー (McCarthy) らの米国特許出願第351, 967号 (これは本願明細書中に組み入れられる) には、カーボン

フィブリルの表面を酸化する方法が記載されており、それはフィブリルの表面を酸化するのに十分な反応条件（例えば、時間、温度、及び圧力）の下でフィブリルと、硫酸(H_2SO_4)や塩素酸カリウム(KClO_3)も包含する酸化剤と接触させることを包含する。マッカーシーらの方法に従って酸化されたフィブリルは非一様に酸化されている、即ち、炭素原子はカルボキシルとアルデヒドとケトンとフェノールとその他の炭化水素基との混合物によって置換されている。

フィブリルは硝酸による処理によっても非一様に酸化された。国際出願PCT/US94/10168には、官能基の混合物を含有する酸化フィブリルの生成が開示されている。また、M. S. ホウゲンバード (Hoogenraad) ら (1994年9月にベルギーのブリュッセルで開催された、不均質触媒の製造のための科学的基礎に関する第6回国際会議で呈示された「新規炭素支持体上に支持された金属触媒(Metal Catalysts supported on a Novel Carbon Support)」) は、フィブリル支持貴金属の製造にはフィブリル表面を硝酸でまず酸化することが有利であることを見いだしている。酸によるかかる前処理は炭素で支持された貴金属触媒の製造では標準工程であり、その場合、かかる炭素の通常の源が与えられたら、望ましくない材料の表面を清浄にすることはそれを官能化するのと同じように役に立つ。

公開された研究において、マッカーシーとベンディングは (McCarthy and Bending, Polymer Preprints ACS Div. of Polymer Chem. 30 (1) 420 (1990))、表面が様々な酸化された基から構成されたことを実証するために酸化フィブリルの誘導体を製造した。彼らが製造した化合物、フェニルヒドラゾン、ハロ芳香族エステル、タリウム塩、等々は、それらの分析有用性、例えば、鮮やかに着色すること、又は何らかのその他の強度及び容易に同定され区別されるしるしを有することを理由に、選ばれた。これら化合物は単離されなかったし、ここに記載される誘導体と違って實際上意味をもたない。

上記の特許及び特許出願に記載されているように、カーボンフィブリルおよびカーボンフィブリル集合体には多くの用途が見いだされているが、フィブリル表面が官能化されるならば多数の異なった重要な用途が開発されるであろう。均一又は不均一どちらかの官能化は官能化されたフィブリルと多様な基質との相互作用

用が独特の性質を有する物質の独特の組成物を生成することを可能にするし、またフィブリル表面の官能性サイト間の結合に基づいてフィブリル構造体がつくられることを可能にする。

発明の目的

本発明の第一の目的は官能化されているフィブリル、即ち、それと組み合わせられた官能性化学成分を有するようにその表面が均一又は不均一に修飾されている(modified) フィブリル、を提供することである。

本発明の別の関連する目的は酸化させる化学的媒体又はその他の化学的媒体との反応によりその表面が官能化されているフィブリルを提供することである。

本発明の更に別の関連する目的はその表面が化学反応によるか又は化学反応性をそれ自身有する種の物理吸着によるかどちらかによって一様に修飾されているフィブリルを提供することである。

本発明の更に別の目的は表面が例えば酸化によって修飾されており官能基との反応によって更に修飾されるフィブリルを提供することである。

本発明の更に別の関連する目的はフィブリルが様々な基質の中の化学基に化学的に反応できる又は物理的に結合できるように表面が或る範囲の官能基によって修飾されているフィブリルを提供することである。

本発明の更に別の関連する目的はフィブリル上の官能基を或る範囲のリンカー化学作用によって互いに連結させることによってフィブリルの錯体構造を提供することである。

本発明の更に別の関連する目的は、各々の場合に、フィブリルの表面と組み合わせられた官能性成分を提供するように、フィブリル表面を化学的に修飾する方法及びフィブリルの表面に種を物理的に吸着させる方法を提供することである。

本発明の更に別の目的は官能化されているフィブリルを基材とした物質の新規合成物を提供することである。

図面の簡単な説明

図1はプレーン フィブリル、カルボキシ フィブリル、およびPEGで修飾されたフィブリルに対するBSA結合の検定を表すグラフである。

図2は2つの異なる方法により製造したカルボキシフィブリル及びPEG修飾

フィブリルに対する β -ラクトグロブリン結合の検定を表すグラフである。

図3は第三アミン フィブリル カラムでのウシ血清アルブミン (bovine serum albumin) (BSA)の溶離プロファイルを表すグラフである。

図4は第四アミン フィブリル カラムでのBSAの溶出プロファイルを表すグラフである。

図5はリジン系のデンドリマー性フィブリル (dendrimeric fibril) を製造するための反応順序である。

図6は鉄フタロシアニン修飾フィブリルの、フローセルでの使用を実証するサイクリックボルタモグラムを表すグラフである。

図7は N_E - (tert-ブトキシカルボニル) -L-リジンの付加によって二官能性フィブリルを製造するための反応順序である。

図8はフィブリルに固定化されたリパーゼを使用しての酪酸エチルの合成の結果を表すグラフである。

図9はアルカリ性ホスファターゼ (AP) と β -ガラクトシダーゼ (βG) の混合物から、AP阻害剤修飾フィブリルを使用して、APを分離した結果を表すグラフである。

図10は βG 修飾フィブリルを使用してAPと βG の混合物から βG を分離した結果を表すグラフである。

発明の詳細な説明

本発明は、広くは式



[式中、

nは整数であり、Lは0.1nより小さい数であり、mは0.5nより小さい数であり、

Rの各々は同一であって、

SO_3H , $COOH$, NH_2 , OH , $R'CHOH$, CHO , CN , $COCl$, ハライド, $COSH$, SH , $COOR'$, SR' , SiR'_3 ,

$Si \leftarrow OR' \rightarrow$, R'_{3-y} , $Si \leftarrow O-SiR'_2 \rightarrow OR'$, R'' , Li , AlR'_2 , $Hg-X$, TlZ_2 および $Mg-X$,

から選ばれ、

yは3以下の整数であり、

R'は水素、アルキル、アリール、シクロアルキル、またはアラルキル、シクロアリール、またはポリ（アルキルエーテル）であり、

R''はフルオロアルキル、フルオロアリール、フルオロシクロアルキル、フルオロアラルキルまたはシクロアリールであり、

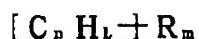
xはハライドであり、そして

Zはカルボキシレートまたはトリフルオロアセテートである]

を有する合成物に関する。

炭素原子、C_nは、実質的に一定の直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素である。ナノチューブは、5より大きい長さ/直径比と、0.5 μより小さい、好ましくは0.1 μより小さい直径を有するものを包含する。ナノチューブは熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブであることもでき、より好ましくは、フィブリル軸上のグラファイト層の突起がフィブリル直径の少なくとも2つ分の距離延びているもの及び/又はそのc軸がその円筒軸に実質的に垂直である円筒状のグラファイトのシートを有するものであることができる。これら組成物はRの各々が同一であることにおいて均一である。

不均一に置換されたナノチューブも製造される。これらは式



（式中、n、L、m、Rおよびナノチューブ自体は上記定義通りであるが、Rの各々が酸素を含有しないこと又はRの各々が酸素含有基である場合にはCOOHが存在しないことを条件とする）の合成物を包含する。

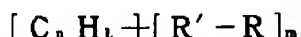
式



（式中、n、L、m、R及び及びR'は上記と同じ意味を有し、そして炭素原子は5より大きい長さ/直径比を有するフィッシュボーン フィブリルの表面炭素である）を有する官能化されたナノチューブも本発明に包含される。これらは均一に又は不均一に置換されている。好ましくは、ナノチューブは熱的外被を含有

せず、そして0.5 μ より小さい直径を有する。

また、本発明には、式



(式中、n、L、m、R' 及びRは上記と同じ意味を有する)を有する官能化されたナノチューブも包含される。炭素原子、 C_n は実質的に一定の直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素である。ナノチューブは5より大きい長さ/直径比と、0.5 μ より小さい、好ましくは、0.1 μ より小さい直径を有する。ナノチューブは、熱分解付着炭素を実質的に含有しないナノチューブであってもよい。より好ましくは、ナノチューブはフィブリル軸上のグラファイト層の突起がフィブリル直径の少なくとも2つ分の距離延びているもの及び/又はそのc軸がその円筒軸に実質的に垂直である円筒状のグラファイトのシートを有するものである。

均一に置換されているナノチューブ及び不均一に置換されているナノチューブどちらにおいても、表面炭素 C_n は反応されている。グラファイト性フィブリルの表面層の中の大抵の炭素原子は、グラファイトにおいてそうであるように、基礎面炭素である。基礎面炭素は化学的攻撃に対して比較的不活性である。欠陥サイトには、例えば、グラファイト平面がフィブリルの周りに完全に延びていないところには、グラファイト平面のエッジ炭素原子と同類の炭素原子が存在する(エッジ及び基礎面の炭素に関する議論については、Urry, Elementary Equilibrium Chemistry of Carbon, Wiley, New York 1989を参照)。

欠陥サイトにおいては、ナノチューブのもっと下の内層のエッジ又は基礎面の炭素が露出しているであろう。用語、表面炭素はナノチューブの最外層の基礎面とエッジの全炭素ばかりでなく、最外層の欠陥サイトにおいて露出しているであろう下層の基礎面及び/又はエッジどちらの炭素をも包含する。エッジ炭素は反応性であり、そして炭素原子価を満たすために或る種のヘテロ原子又は基を含有しなければならない。

上記の置換ナノチューブは有利には更に官能化されてもよい。かかる合成物は式



〔式中、炭素はナノチューブの表面炭素であり、n、Lおよびmは上記の通りであり、

Aの各々は

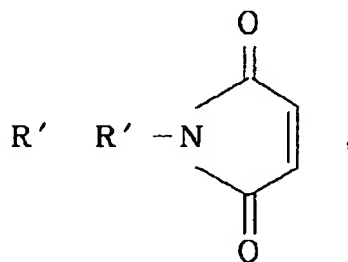
OY, NHY, $\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-OY$, $\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NR'Y$, $\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-SY$, $\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-Y$, $-CR'_2-OY$, $N=Y$, $-NHCY$ または $C=Y$,
から選ばれ、

Yは、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素、抗体、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、抗原、又は酵素基質、酵素阻害剤又は酵素基質の遷移状態類似体の適切な官能基であり、又は

$R'-OH$, $R'-NR'_2$, $R'-SH$, $R'-CHO$, $R'-CN$, $R'-X$,

$R'N^+(R')_3X^-$, $R'SiR'_3$, $R'Si\leftarrow OR'\rightarrow$, R'_3 , ,
 $R'Si\leftarrow O-SiR'_3\rightarrow OR'$, $R'-R''$, $R'-N-CO$,
 $(C_2H_4O)_wH$, $\leftarrow C_3H_6O\rightarrow_wH$, $\leftarrow C_2H_4O\rightarrow_w-R'$,

$(C_3H_6O)_w-R'$,



から選ばれ、

そしてwは1より大きくかつ200より小さい整数である〕

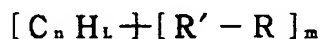
の合成物を包含する。

炭素原子、 C_n は、直径が実質的に一定である実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素である。ナノチューブは5より大きい長さ／直径比と、 0.1μ より小さい、好ましくは 0.05μ より小さい直径とを有するものを包含する。ナノチューブはまた、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円

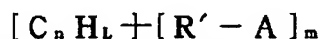
筒状のグラファイト性ナノチューブであることができる。より好ましくは、それ

らはフィブリル軸上のグラファイト層の突起がフィブリル直径の少なくとも2つ分の距離延びていることを特徴とし、及び／又はそれらはそのc軸がその円筒軸に実質的に垂直である円筒状のグラファイトのシートから構成されている。好ましくは、ナノチューブは熱的オーバーコートを含みせず、そして0.5 μより小さい直径を有する。

構造

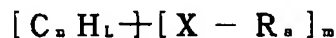


の官能性ナノチューブは、式



を有する合成物を生成するように官能化されてもよい。式中、n、L、m、R' およびAは上記定義通りである。炭素原子、C_nは、実質的に一定の直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素である。ナノチューブは5より大きい長さ／直径比と、0.5 μより小さい、好ましくは0.1 μより小さい直径とを有するものを包含する。ナノチューブはまた、熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブであることができる。より好ましくは、それらはフィブリル軸上のグラファイト層の突起がフィブリル直径の少なくとも2つ分の距離延びていることを特徴とし、及び／又はそれらはそのc軸がその円筒軸に実質的に垂直である円筒状のグラファイトのシートから構成されている。好ましくは、ナノチューブは熱的オーバーコートを含みせず、そして0.5 μより小さい直径を有する。

本発明の合成物は或る種の環状化合物が吸着されているところのナノチューブも包含する。これらは、式



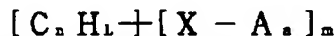
(式中、nは整数であり、Lは0.1 nより小さい数であり、mは0.5 nより小さい数であり、aはゼロであるか又は10より小さい数であり、Xは多核芳香族、ポリヘテロ核芳香族またはメタロポリヘテロ核芳香族成分であり、そしてRは上記の通りである)の物質の合成物を包含する。炭素原子、C_nは、実質的に

一定の直径を有する実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素である。ナノチューブは5より大きい長さ／直径比と、0.5 μ より小さい、好ま

しくは0.1 μ より小さい直径とを有するものを包含する。ナノチューブはまた熱分解付着炭素を実質的に含有しない実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブであることができ、そしてより好ましくは、前記フィブリル軸上のグラファイト層の突起がフィブリル直径の少なくとも2つ分の距離延びていることを特徴とするもの及び／又はそのc軸がその円筒軸に実質的に垂直である円筒状のグラファイトのシートを有するものであることができる。好ましくは、ナノチューブは熱的オーバーコートを含むせず、そして0.5 μ より小さい直径を有する。

好ましい環状化合物は、コットンとウィルキンソンのアドバンスト オーガニック ケミストリー (Cotton and Wilkinson, Advanced Organic Chemistry) の76頁に記載されている通りの平面状の大環式化合物である。より好ましい環状化合物はポリフィリンおよびフタロシアニンである。

吸着された環状化合物は官能化されてもよい。かかる組成物は、式



(式中、m、n、L、a、XおよびAは上記定義通りであり、そして炭素は上記の通り実質的に円筒状のグラファイト性ナノチューブの表面炭素である)の化合物を包含する。

上記のように官能化されたカーボンフィブリルはマトリックスの中に組み入れられてもよい。好ましくは、マトリックスは有機重合体(例えば、熱硬化樹脂、例えば、エポキシ、ビスマレイミド、ポリアミド、またはポリエステル樹脂; 熱可塑性樹脂; 反応射出成形樹脂; またはエラストマー、例えば、天然ゴム、スチレン-ブタジエンゴムまたはシス-1,4-ポリブタジエン); 無機重合体(例えば、ポリマー性無機酸化物、例えばガラス)、金属(例えば、鉛または銅)、またはセラミック材料(例えば、ポルトランド セメント)である。フィブリルを組み入れてあるマトリックスからビーズを形成してもよい。代替では、官能化されたフィブリルを官能化されたビーズの外表面に結合させることができる。

特定の理論に拘束するつもりはないが、官能化されたフィブリルは改質された

表面特性が重合体との混和性がより良いので、又は修飾された官能基（特に、ヒドロキシ又はアミン基）が末端基として重合体に直接結合するので、重合体の系の中により良く分散される。この手法では、ポリカーボネート、ポリウレタン、

ポリエステル又はポリアミド／イミドのようなポリマー系はフィブリルに直接結合してフィブリルを改良された付着性をもって分散させることを容易にする。

本発明はまた、カーボン フィブリルと強い酸化剤とを、前記フィブリルの表面を酸化するのに十分な時間接触させ、そして更に前記フィブリルを酸化表面に官能基を付加するのに適する反応体と接触させることによってカーボン フィブリルの表面に官能基を導入する方法にある。本発明の好ましい態様においては、酸化剤は強酸中のアルカリ金属塩素酸塩の溶液からなる。本発明の別の態様においては、アルカリ金属塩素酸塩は塩素酸ナトリウム又は塩素酸カリウムである。好ましい態様においては、使用される強酸は硫酸である。酸化に十分な時間は約 0.5 時間～約 24 時間である。

別の好ましい態様においては、式 $[C_nH_L-CH(R')OH]_m$

（式中、n、L、R' およびmは上記定義通りである）を有する組成物は、過酸化ベンゾイルのようなラジカル開始剤の存在下でR'CH₂OHをナノチューブの表面炭素と反応させることによって生成される。

本発明はまた、NHSエステルによって修飾されたナノチューブにタンパク質を、NHSエステルとタンパク質のアミノ基との間に共有結合を形成することによって、結合させる方法にある。

本発明はまた、カーボンフィブリルの表面を酸化するのに十分な時間カーボンフィブリルと酸化剤を接触させ、表面酸化されたカーボンフィブリルをカーボンフィブリルの表面に官能基を付加するのに適する反応体と接触させ、そして表面官能化されたフィブリルをカーボンフィブリルの網状構造を生成するのに有効な架橋剤と更に接触させることを含む、カーボンフィブリルの網状構造を生成する方法にある。好ましい架橋剤はポリオール、ポリアミンまたはポリカルボン酸である。

官能化されたフィブリルはフィブリルの硬質網状構造を製造するのにも有効で

ある。酸官能化フィブリルのよく分散された三次元網状構造は、例えば、酸基（インターフィブリル）をポリオールまたはポリアミンによって架橋結合させて硬質網状構造を形成することによって安定化されてもよい。

本発明はまた、本発明の官能化されたフィブリルを連結させることによって形

成された三次元網状構造を包含する。これら複合体は直接結合又は化学成分を含む一つまたはそれ以上のリンカーによって連結された少なくとも2つの官能化されたフィブリルを包含する。これら網状構造は顕著に一様な均等な孔径の多孔性媒体を構成する。それらは吸着剤、触媒支持体及び分離膜として有効である。

これらフィブリル間の隙間は大きさ及び形状どちらにおいても不規則であるけれども、それらは多孔質として考えることができ、そして多孔性媒体を特徴付けるのに使用した方法によって特徴付けられる。かかる網状構造の中の隙間の大きさはフィブリルの分散の濃度とレベル及び架橋剤の濃度と鎖長によってコントロールすることができる。かかる材料は構造化された触媒支持体として作用することができ、そして特定の大きさの分子を排除又は包含するように調節されてもよい。通常の工業用触媒の外に、それらは生体触媒(biocatalyst)のための大きな気孔の多孔性支持体として特殊な用途を有する。

硬質網状構造は分子認識のための生体模倣系における骨格としても役立つことができる。かかる系は米国特許第5, 110, 833号および国際特許公報WO 93/19844号に記載されている。架橋剤及び錯化剤についての適切な選択は特異な分子フレームワークの安定化を可能にする。

ナノチューブを官能化する方法

本発明の均一に官能化されたフィブリルはスルホン化や、脱酸素化されたフィブリル表面への求電子付加や、メタレーションによって直接に製造できる。アーク成長ナノチューブを使用する場合には、官能化に先立って長大な精製を必要とするかも知れない。エバスンらは(Ebbesen et al., Nature 367 519 (1994))、かかる精製のための手順を与えている。

好ましくは、カーボンフィブリルはそれらを官能化剤と接触させる前に加工される。かかる加工はフィブリルを溶剤中に分散させることを包含するであろう。

場合によっては、それから、カーボンフィブリルは更なる接触に先立って濾過され乾燥される。

1. スルホン化

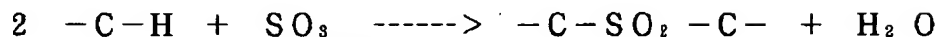
背景技術は次の文献に記載されている：March, J.P., Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., Wiley, New York 1985 ; House, H., Modern

Synthetic Reactions, 2nd Ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA 1972

。活性化されたC-H（芳香族のC-Hも含まれる）結合はSO₃、を20%まで含有する濃硫酸の溶液である発煙硝酸(oleum)を使用してスルホン化することができる。通常の方法は発煙硫酸を使用してT約80℃における液相を通してである：しかしながら、活性化されたC-H結合は不活性な非プロトン性溶媒中のSO₃又は蒸気相中のSO₃を使用してスルホン化することも可能である。反応は次の通りである：



過剰反応は次の反応に従ってスルホンの生成を生じる：



実施例1

硫酸の使用によるC-H結合の活性化

反応は気相中と溶液中で行い、結果に有意差を生じなかった。蒸気相反応はリンドバーク炉によって加熱された水平石英管反応器の中で行った。気体流入／流出管を装着した、濃硫酸中にSO₃20%を含有する多ロフラスコを、SO₃源として使用した。

磁製ボートの中のフィブリル（BNまたはCC）の秤量試料を、気体導入口を装備した1インチ管の中に入れた；流出口は濃硫酸バブラートラップ（bubbler trap）に接続した。反応器全体にアルゴンを20分間フラッシュして全空気を除き、そして試料を300℃に1時間加熱して残留水分を除去した。乾燥後、アルゴン下で温度を反応温度に調節した。

所定温度が安定化されたら、SO₃源を反応器管に接続し、そしてアルゴン流

を使用して SO_3 蒸気を石英管反応器の中に送った。反応は所定温度で所定時間行い、その後で反応器をアルゴン流の下で冷却した。それからフィブリルを 5" Hg 真空で 90℃ で乾燥して乾燥重量利得を得た。スルホン酸 ($-\text{SO}_3\text{H}$) 含有量は 0.100N の NaOH との反応および終点として pH 6.0 を使用しての 0.100N の HCl による逆滴定によって求めた。

液相反応は温度計／温度コントローラー及び磁気攪拌機を装着した 100cc の多ロフラスコの中で SO_3 20% を含有する濃硫酸中で行った。濃硫酸 (50)

の中のフィブリルスラリーをフラスコに入れた。発煙硫酸溶液 (20cc) を反応器に加える前に約 60℃ に予め加熱した。反応後、酸スラリーを砕いた米の上に注ぎ、そして直ちに 1 リットルの脱イオン水で希釈した。固体を濾過し、そして洗浄排出液の pH が変化しなくなる迄、脱イオン水で完全に洗浄した。フィブリルを 5" Hg 真空で 100℃ で乾燥した。濾過での移し替えによる損失のせいで、厳正な重量増加は観察されなかった。結果は表 1 に列挙されている。

表 1
反応のまとめ

実施例	実験 #	反応	試料重量 wt. g	フィブリルの タイプ	T° C	時間	乾燥重量 増加	SO_3H 濃度 meq/g
1A	118-60A	気相	0.20	CY	110	15 m	9.3%	0.50
1B	118-61A	気相	0.20	BN	100	30 m	8.5%	0.31
1C	118-61B	気相	0.20	BN	65	15 m	4.2%	0.45
1D	118-56A	液相	1.2	CY	50	10 m		0.33
1E	118-56B	液相	1.0	CY	25	20 m		0.40

蒸気相または液相での反応によるスルホン酸含量に有意差はなかった。温度効果はあった。より高い温度の反応 (蒸気相) はより高い量のスルホンを与える。118-61B では、4.2% の重量増加はスルホン酸含量と一致した (理論値は 0.51 meq/g であった)。実験 60A および 61A はスルホン酸含量によるだけと説明するには高すぎる重量増加を有した。従って、かなりの量のスルホンも製造されたと推定された。

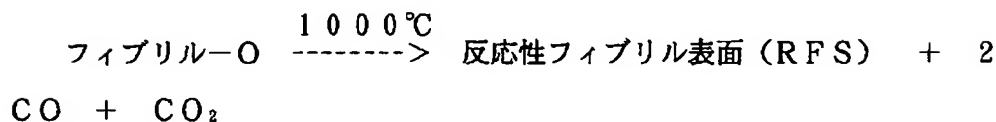
2. 酸化物を含有しないフィブリル表面への付加

背景技術は次の文献に記載されている：Urry, G., Elementary Equilibrium Chemistry of Carbon, Wiley, New York 1989。

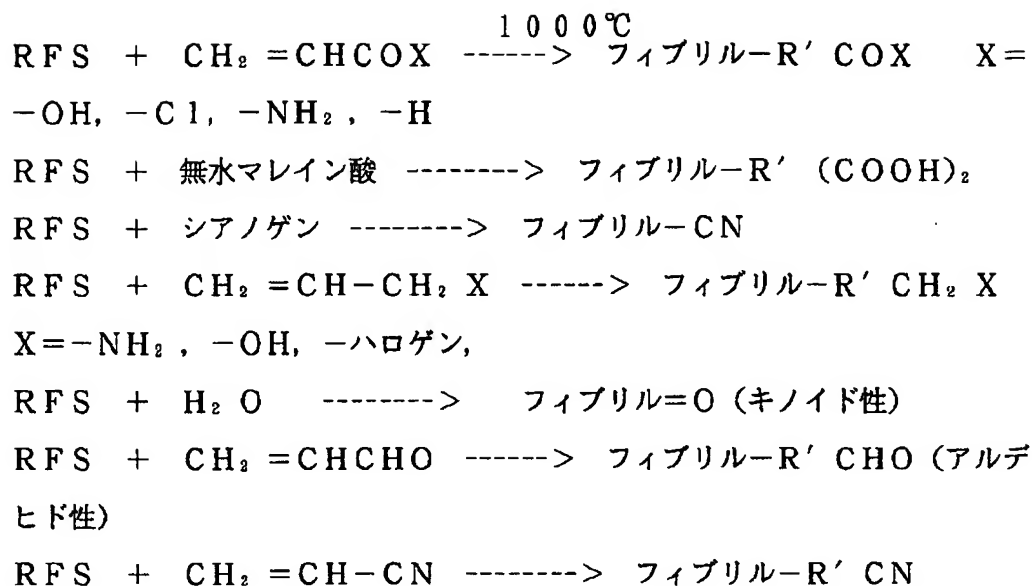
フィブリルの中の表面炭素はグラファイトのように挙動する、すなわち、それらは基礎面とエッジ両方の炭素を含有する六方晶シート(hexagonal sheet)の状態で配列されている。基礎面炭素は化学的攻撃に比較的不活性であるが、エッジ炭素は反応性であり、そして炭素原子価を満たすために或る種のヘテロ原子また

は基を含有しなければならない。フィブリルは、基本的にエッジ炭素であり且つヘテロ原子または基を含有するところの表面欠陥サイトも有している。

フィブリルの表面炭素に結合した最も普通のヘテロ原子は次のものである：水素、製造中の主な気体成分；酸素、その高い反応性のせい及びその痕跡を回避するのが非常に難しいせい；及びH₂O、それは触媒のせいで常に存在する。真空中での約1000℃における熱分解はメカニズムが未知であるが化学量論量がわかっている複雑な反応で表面を脱酸素化するであろう。生成物は2：1比のCOとCO₂である。得られるフィブリル表面はC₁—C₄配列における基を含有しており、それら基は活性化されたオレフィンに対して非常に反応性である。表面は真空中で又は不活性気体の存在下で安定であるが、反応性気体に曝されるまではその高い反応性を維持する。従って、フィブリルは真空中で又は不活性雰囲気下で約1000℃で熱分解されること、これら同一条件下で冷却されること、そしてより低い温度で適切な分子と反応して安定な官能基を与えることができる。代表的な例は次の通りである：



引き続き：



但しR' は炭化水素基 (アルキル、シクロアルキル、等)

実施例2

アクリル酸と無酸化物フィブリル表面との反応による

官能化されたフィブリルの製造

磁製ボートの中の1gのBNフィブリルを、熱電対を装着した水平の1" 石英管の中に入れ、そしてリンドバーク管炉の中に置いた。端部に気体流入口/流出口を装着した。管を乾燥脱酸素アルゴンで10分間パージした後に、炉の温度を300℃に上げて30分維持した。その後で、アルゴンの連続流の下で、温度を100℃増分で1000℃まで昇げ、そして16時間維持した。その後で、管をアルゴン流の下で室温 (RT) に冷却した。それから、アルゴンの流れをそらして50℃の純粋な精製アクリル酸を含有し気体流入口/流出口を装着した多ロフラスコを通るようにした。アクリル酸/アルゴン蒸気の流れはRTで6時間継続した。その後、残留した未反応アクリル酸の除去を、まずアルゴンによるパージによって、それから<5" 真空で100℃での真空乾燥によって、行った。カルボン酸含量は、過剰の0.100NのNaOHとの反応とpH7.5の終点まで0.100NのHClで逆滴定することによって測定した。

実施例3

アクリル酸と無酸化物フィブリン表面との反応による

官能化されたフィブリンの製造

手順は熱分解と冷却を 10^{-4} トール真空で行ったこと以外は上記手順と同じように繰り返した。精製アクリル酸蒸気は上記手順におけるようにアルゴンで希釈した。

実施例 4

マレイン酸と無酸化物フィブリン表面との反応による

官能化されたフィブリンの製造

手順はRTにおける反応体が精製した無水マレイン酸 (MAN) であり、それがアルゴン気体を 80°C の溶融MAN浴に通すことによって反応器に供給されたこと以外は実施例 2 と同じように繰り返した。

実施例 5

塩化アクリロイルと無酸化物フィブリン表面との反応による

官能化されたフィブリンの製造

手順はRTにおける反応体が精製した塩化アクリロイルであり、それがアルゴン気体を 25°C の純粋な塩化アクリロイルの上に通すことによって反応器に供給されたこと以外は実施例 2 と同じように繰り返した。酸塩化物の含量は、過剰の 0.100N の NaOH との反応と 0.100N の HCl による逆滴定によって測定した。

真空中でのフィブリンの熱分解はフィブリン表面を脱酸素化した。TGA装置では、真空中での又は精製Ar流の中での 1000°C における熱分解はBNフィブリンの3つの試料について3%の平均重量損失を与えた。ガスクロマトグラフ分析はそれぞれ約2:1の比のCOとCO₂だけを検出した。得られた表面は非常に反応性であり、そして活性化オレフィン、例えば、アクリル酸、塩化アクリロイル、アクリルアミド、アクロレイン、無水マレイン酸、アリルアミン、アリルアルコールまたはハロゲン化アリルは室温でさえ反応して活性化オレフィンに結合したその官能基だけを含有する清浄な生成物を生成するであろう。従って、カルボン酸だけを含有する表面はアクリル酸または無水マレインとの反応によ

て入手可能であり；酸塩化物だけを含有する表面は塩化アクリロイルとの反応によって；アルデヒドだけを含有する表面はアクロレインから；ヒドロキシルだけを含有する表面はアリルアルコールから；アミンだけを含有する表面はアリルアミンから；そしてハライドだけを含有する表面はハロゲン化アリルから、入手可能である。

3. メタレーション

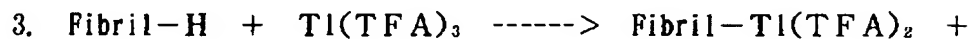
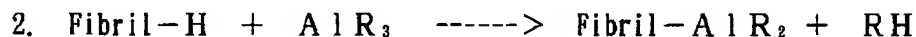
背景技術は次の文献に記載されている：March, Advanced Organic Chemistry, 3rd ed., p 545。

芳香族C-H結合は様々な有機金属試薬によってメタレートされて炭素-金属結合(C-M)を生成することができる。Mは通常、Li、Be、Mg、Al、またはTiである；しかしながら、その他の金属も使用できる。最も簡単な反応は活性化された芳香族の中の水素の直接置換によるものである：



反応は更に、強塩基、例えば、カリウムt-ブトキシド、またはキレート化用

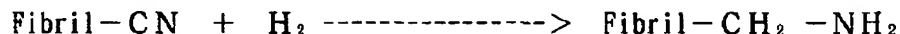
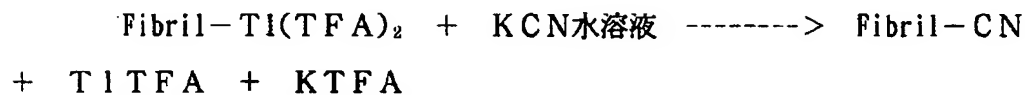
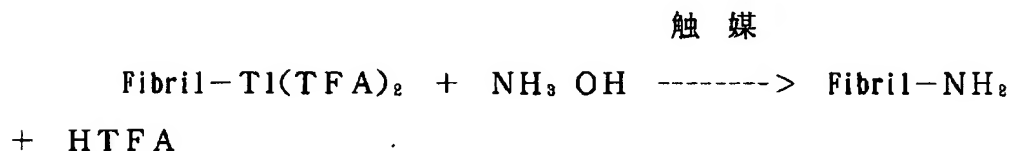
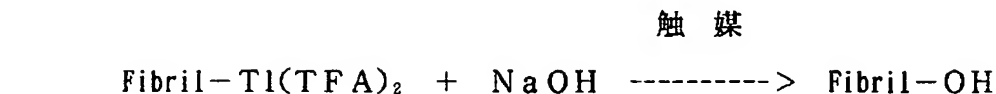
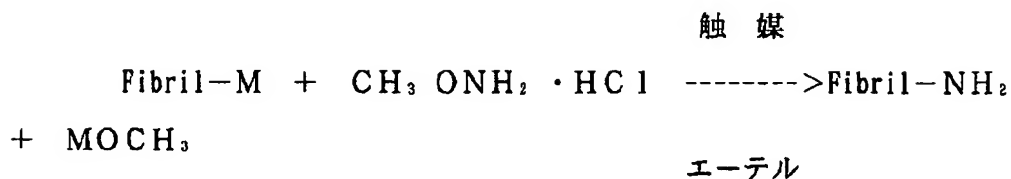
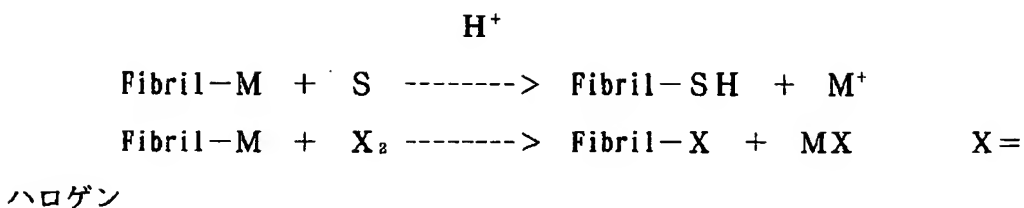
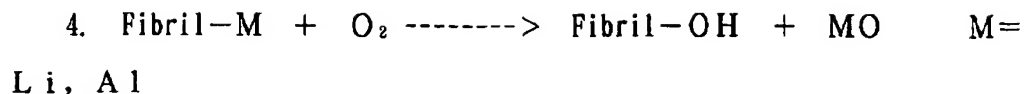
ジアミンを必要とするかも知れない。非プロトン性溶媒は必要である（パラフィン、ベンゼン）。



HTFA

TFAはトリフルオロアセテート。HTFAはトリフルオロ酢酸。

メタレート誘導体は第一の単独官能化されたフィブリルの例である。しかし、それらを更に反応させて別の第一の単独官能化されたフィブリルを与えることができる。いくつかの反応は中間体を単離せずに同じ装置で順次実施できる。



実施例6

フィブリル-Liの製造

1 gのCCフィブリルを磁製ボートに入れ、そしてリンドバーク管炉の中に閉じ込められている1"石英管反応器の中に挿入した。管の端部は気体流入口/流出口を装着された。H₂の連続流の下で、フィブリルを700℃に2時間加熱して全ての表面の酸素化物をC-H結合に転化した。それから、反応器をH₂流の下でRTに冷却した。

水素化されたフィブリルを、脱酸素化した乾燥ヘプタンと共に (LiAlH₄と共に)、1リットルの多口丸底フラスコに移した。このフラスコには、全ての空気を除去し不活性雰囲気に維持するための精製アルゴンのパージシステム、冷却器、磁気攪拌機およびゴム隔膜 (それを通してシリングで液体を加えることができ

る)が装備されていた。アルゴン雰囲気下で、ヘプタン中に5ミリモルのブチルリチウムを含有する2%溶液をシリンジによって加え、そしてこのスラリを穏やかな還流下で4時間攪拌した。その後、フィブリルをアルゴン雰囲気グローブボックスの中で重力濾過によって分離し、そしてフィルター上で脱酸素化乾燥ヘプタンによって数回洗浄した。フィブリルを活栓付きの50cc丸底フラスコに移し、そして 10^{-4} トル真空下で50℃で乾燥した。リチウム含量は、フィブリルの試料をDI水(脱イオン水)中で過剰の0.100NのHClと反応させ0.100NのNaOHでpH5.0の終点まで逆滴定することによって測定した。

実施例7

フィブリル-Tl(TFA)₂の製造

1gのCCフィブリルを実施例5のように水素化し、そして多口フラスコの中に、乾燥アルゴンによる繰り返しパージによってガス抜きされているHTFAと共に装填した。HTFA中の5ミリモルTl(TFA)₂の5%溶液をゴム隔膜からフラスコに加え、そしてこのスラリを穏やかな還流下で6時間攪拌した。反応後に、フィブリルを実施例1のように集め乾燥した。

実施例8

フィブリル-OHの製造

(OH官能化だけを含有する酸素化誘導体)

実施例6で製造したリチウム化フィブリルの0.5gを脱酸素化乾燥ヘプタンと共に、アルゴン雰囲気グローブバックの中で、活栓と磁気攪拌棒を付けた50cc一口フラスコに移した。フラスコをグローブバックから取り出し、そして磁気攪拌機で攪拌した。それから、活栓を大気に対して開き、そしてスラリを24時間攪拌した。その後で、フィブリルを濾過によって分離し、そしてMeOH水溶液で洗浄し、そして5"真空で50℃で乾燥した。OH基の濃度は、ジオキサン中の無水酢酸の標準化溶液(0.252M)と80℃で反応させてOH基を酢酸エステルに転化することによって求めた。そうした場合、反応した酸無水物1モル当たり1当量の酢酸が放出される。全体の酸含量、遊離酢酸と未反応無水酢酸、は0.100NのNaOHでpH7.5の終点まで滴定することによって測定

した。

実施例 9

フィブリル-NH₂の製造

1 g のタリウム化フィブリルを実施例 7 のように製造した。フィブリルをジオキサンの中にスラリー化し、そしてジオキサンに溶解した 0.5 g のトリフェニルホスフィンを加えた。スラリーを 50℃ で数分攪拌した後に、50℃ のアンモニア気体を 30 分間加えた。それから、フィブリルを濾過によって分離し、ジオキサン中で、それから DI 水中で洗浄し、そして 5" 真空で 80℃ で乾燥した。アミン濃度は、過剰の無水酢酸と反応させ遊離酢酸と未反応無水酢酸を 0.100 N の NaOH で逆滴定することによって測定した。

4. 誘導化された多核芳香族、ポリヘテロ核芳香族

及び平面大環式の化合物

フィブリルのグラファイトの表面は芳香族化合物の物理的吸着を可能にする。吸引はファンデルワールス力による。この力は多環ヘテロ核芳香族化合物とグラファイト表面の基礎面炭素との間にかなりある。脱着は競合表面吸着が可能である条件下で又は吸着質が高い溶解度を有する条件下で起こるのであろう。

例えば、フィブリルはフタロシアニン誘導体の吸着によって官能化されることができる。それから、これらフタロシアニン誘導体フィブリルはタンパク質の固体支持体として使用できる。異なる化学基をフィブリル表面に導入することは単

にフタロシアニンの異なる誘導体を選択することによって可能である。

タンパク質を固定化するためにフタロシアニン誘導体フィブリルを使用することは従来のタンパク質固定化方法よりも有意な利点を有する。特に、それは共有結合修飾よりも簡単である。加えて、フタロシアニン誘導体フィブリルは高い表面積を有し、そして広範囲の温度及び pH にわたってどの種類の溶媒中でも安定である。

実施例 10

フィブリル上へのポリフィリン及びフタロシアニンの吸着

フィブリル上に物理吸着するのに好ましい化合物は、グラファイトまたはカー

ボンブラックに強く吸着することが知られている誘導化されたポリフィリンまたはフタロシアニンである。幾つかの化合物が入手可能であり、例えば、テトラカルボン酸ポリフィリン、コバルト (II) フタロシアニンまたはニリチウムフタロシアニン。後者の2つはカルボン酸形態に誘導化されることができる。

ニリチウムフタロシアニン

一般に、大抵の金属 (特に多価) 錯体によってフタロシアニン (Pc) 基から2つの Li^+ イオンが放逐される。従って、不安定でない配位子と結合した金属イオンによる Li^+ イオンの置換はフィブリル表面上に安定な官能基を置く方法である。ほぼ全部の遷移金属錯体はPcから Li^+ を放逐して安定な、非不安定性のキレートを生成するであろう。それから、要点はこの金属に適する配位子と結合させることである。

コバルト (II) フタロシアニン

このためにはコバルト (II) 錯体が特に適する。 Co^{++} イオンは2つの Li^+ イオンの代わりに置換できる。それから、 Co^{++} イオンは、垂下 (pendant) カルボン酸基を有するピリジン環を含有しているニコチン酸のような配位子に配位することができ、それはピリジン基に優先的に結合することが知られている。過剰のニコチン酸の存在下では、 $\text{Co}(\text{II})\text{Pc}$ は電気化学的に酸化されて $\text{Co}(\text{III})\text{Pc}$ になることができ、ニコチン酸のピリジン成分と不安定でない錯体を形成する。従って、ニコチン酸配位子の遊離カルボン酸基はフィブリル表面にしっかりと結合している。

その他の適する配位子はアミノピリジン又はエチレンジアミン (垂下 NH_2)、メルカプトピリジン (SH)、又は、一方の端にアミノ又はピリジル成分どちらかをそして他端に何らかの望ましい機能を含有するその他の多官能性配位子である。

ポリフィリンまたはフタロシアニンのローディング容量 (loading capacity) は、それらを漸増添加したときの溶液の脱色によって測定できる。溶液の深い色 (MeOH中のテトラカルボン酸ポリフィリンでは深いピンク色、アセトンまたはピリジン中の $\text{Co}(\text{II})$ またはニリチウムフタロシアニンでは暗い青-緑色)

は、分子がフィブリルのブラック表面への吸着によって除去されたときには変化する。

ローディング容量はこの方法によって推定し、そして誘導体のフットプリントはその近似測定（約140平方オングストローム）から算出した。平均では、フィブリルの表面積は $250\text{ m}^2/\text{g}$ であり、最大ローディングは約0.3ミリモル/gであろう。

テトラカルボン酸ポルフィリンを滴定によって分析した。吸着の保全性は周囲温度と高温における水性系での色放出によって試験した。

フィブリルスラリを最初に混合（ワーリング ブレンダー(Waring blender)）し、そしてローディングの間中攪拌した。色がもはや変化しなくなった後にスラリの一部を超音波処理したが、効果がなかった。

ローディング後、実験169-11-12、-14及び-19-1（表II参照）は同じ溶媒中で洗浄して吸蔵顔料を除去した。全てが洗浄流出液中に連続して弱い色を示したので、正確に飽和点を求めることが難しかった。実験168-18及び-19-2はローディングのための計算した量の顔料を使用し、そしてローディング後に非常に軽く洗浄した。

テトラカルボン酸ポルフィリン（アセトンから）及びC₆フタロシアニン（ピリジンから）は更に特徴表示するためにフィブリル上にローディングされた（それぞれ、実験169-18及び-19-2）。

テトラカルボン酸ポルフィリンの分析

過剰塩基の添加（pH11～12）は滴定するスラリに直ちにピンク色の着

色を生じさせた。これは滴定を妨害しなかったが、高いpHではポルフィリンが脱着されることを示していた。カルボン酸濃度は終点としてpH7.5を使用する過剰NaOHの逆滴定によって測定した。滴定は酸1g当り1.10meqのローディングを与え、それはポルフィリン1g当り0.275meqに等しかった。

コバルトまたはニリチウムフタロシアニンの分析

これらの吸着質の濃度は脱色実験だけから推定した。青-緑の色が30分後に

退色しなかった場合の点を飽和点とした。多数の、置換された多核芳香族又はポリヘテロ核芳香族の化合物がフィブリル表面に吸着された。付着力のためには、芳香族環の数は環／垂下官能基当り2つより多くすべきである。従って、3つの縮合環を含有する置換アントラセンやフェナントレン等、又は4つ以上の縮合環を含有する多官能性誘導体はポルフィリン又はフタロシアニン誘導体の代わりに使用できる。同様に、置換された芳香族ヘテロ環式化合物例えばキノリン、又は4つ以上の環を含有する多置換されたヘテロ芳香族化合物を使用できる。

表IIには、3種類のポルフィリン／フタロシアニン誘導体についてのローディング実験の結果をまとめてある。

表II
吸着実験のまとめ

実施例	実験 #	吸着質	71ブリル 重量(g)	溶媒	ローディング		meq/g
					g/g	形態	
10A	169-11	TCAPorph	19.6mg	Acet	0.18g/g	酸	na
10B	169-12	TCAPorph	33.3mg	H ₂ O	0.11	Na塩	na
10C	169-14	DiLiPhth	119.0mg	Acet	0.170	Li	na
10D	169-19-1	CoPhth	250.0mg	Pyr	0.187	Co	0.335(cal)
10E	169-18	TCAPorph	1.00g	Acet	0.205	酸	1.10(T)
10F	169-19-2	CoPhth	1.40g	Pyr	0.172	Co	0.303(cal)

TCAPorphは、テトラカルボン酸ポルフィリンである。

(cal)は、計算値である。

DiLiPhthは、ニリチウムフタロシアニンである。

CoPhthは、コバルト (II) フタロシアニンである。

(T)は、滴定である。

次の実施例11および12は2種類の異なるフタロシアニン誘導体をカーボンナノチューブ上に吸着させる方法を説明する。

実施例11

ニッケル (II) フタロシアニンテトラスルホン酸の吸着
によって官能化されたフィブリル

2 mgのニッケル (II) フタロシアニンテトラスルホン酸 (四ナトリウム塩) を 1 ミリリットルの dH_2O の中で 4. 2 mgのプレーン フィブリンと混合した。この混合物を超音波で 30 分処理し、そして室温で一晩回転させた。

フィブリンを 1 ミリリットルの dH_2O で 3 回、1 ミリリットルの $MeOH$ で 3 回、そして 1 ミリリットルの CH_2Cl_2 で 3 回洗浄し、そして真空下で乾燥した。

これらのフタロシアニン誘導体フィブリンにサーモリシンを吸着によって固定化した。0. 5 mgのフィブリンを 250 マイクロリットルの dH_2O の中に懸濁させ、そして超音波で 20 分処理した。上澄み液を捨て、そしてフィブリンを 250 マイクロリットルの 0. 05 Mのトリス (Tris) ($pH=8. 0$) の中に懸濁させ、そして同じ緩衝液中でつくった 0. 6 mMのサーモリシン (thermolysin) 溶液の 250 マイクロリットルと混合した。この混合物を室温で 2 時間回転させ、そして $4^{\circ}C$ で一晩貯蔵した。それから、フィブリンを 1 ミリリットルの 25 mMのトリス ($pH=8$) で 3 回洗浄し、そして 40 mMのトリスと 10 mMの $CaCl_2$ を含有する $pH 7. 5$ の緩衝液の 250 マイクロリットルの中に懸濁させた。

これらフィブリン上のサーモリシンの量はフィブリンの酵素活性度を測定することで求めた。サーモリシンは基質 FAGLA (N- (3- [2-フリル] アクリロニトリル) -グリロイアミド) と反応することができ、そして 345 nmで

$-310 M^{-1}cm^{-1}$ の吸光係数をもつ吸光度低下を起こす化合物を生成する。この反応のためのアッセイ緩衝条件は $pH 7. 5$ の、40 mMのトリス、10 mMの $CaCl_2$ および 1. 75 Mの $NaCl$ であった。反応は 1 ミリリットルの浅鉢の中で、5 マイクロリットルの FAGLAストック溶液 (dH_2O 中の 30% DMF の中の 25. 5 mM) を 1 ミリリットルのアッセイ緩衝液中の 10 μg のサーモリシンフィブリンと混合することによって行った。345 nmにおける吸光度低下を 10 分間にわたる時間走査によってモニターした。それから、酵素活性度 ($\mu M/分$) は $-310 M^{-1}cm^{-1}$ の吸光係数を使用して初期勾配から算出した。フィブリン 1 g 当りの活性サーモリシンの量は 0. 61 μ モルであった。

実施例 12

1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25-オクタプトキシ

－29H, 31H－フタロシアニンの吸着
によって官能化されたフィブリル

1ミリリットルの CHCl_3 の中で、3mgの1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25－オクタブトキシ－29H, 31H－フタロシアニンと、5.3mgのブレン フィブリルを混合した。この混合物を超音波で50分処理し、そして室温で一晩回転させた。

フィブリルを1ミリリットルの CH_2Cl_2 で3回洗浄し、そして真空下で乾燥した。

これらフタロシアニン誘導体フィブリルの上にサーモリシンを実施例34の方法に従って吸着によって固定化した。フィブリル1g当りの活性サーモリシンの量は0.7 μ モルであった。

実施例13

サーモリシンがその上に固定化されている
フタロシアニン誘導体フィブリルを使用する
アスパルターム前駆体の合成

サーモリシンがその上に固定化されているフタロシアニン誘導体フィブリルは、人工甘味料アスパルタームの前駆体の合成を触媒するために使用できる。反応は10 μ Mのフィブリル固定化サーモリシンを有する酢酸エチルの中で80mMのL

－Z－Aspと220mMのL－Phe oMeを混合することによって行った。生成物、Z－Asp－Phe oMeは収量を測定するためにHPLCによって監視した。

5. 塩素酸塩または硝酸による酸化

濃硫酸中の塩素酸カリウムや、硝酸のような、強い酸化剤によるグラファイトの酸化に関する文献としては、次のものが挙げられる：R.N. Smith, Quarterly Review 13, 287 (1959) ; M.J.D. Low, Chem. Rev. 60, 267 (1960) 。一般に、エッジ炭素（欠陥サイトも包含する）は攻撃されてカルボン酸、フェノール及びその他の酸素化された基の混合物を与える。メカニズムはラ

ジカル反応を含む複雑なものである。

実施例 1 4

塩素酸塩を使用しての

カルボン酸で官能化されたフィブリルの製造

濃硫酸の中にCCフィブリルの試料をへらで混ぜることによってスラリ化し、それから気体流入口／流出口及び頭上攪拌機を装着し反応フラスコに移した。攪拌しながら、そしてゆっくりしたアルゴン流の下で、 NaClO_3 の装填を実験の時間中にRTで数回に分けて行った。実験の全過程に塩素蒸気が発生するので反応器から塩素蒸気をスウィープしてNaOH水溶液トラップに送り込んだ。実験の最後に、砕いた氷の上にフィブリルスラリを注ぎ、そして減圧濾過した。それから、濾過ケーキをソックスレー円筒濾紙に移し、そしてソックスレー抽出器でDI水によって洗浄し、数時間毎に新鮮な水に交換した。新鮮DI水を加えたときにフィブリルの試料が水のpHを変化させなくなるまで洗浄を継続した。それから、フィブリルを濾過によって分離し、そして5" 真空で100℃で一晩乾燥した。

カルボン酸含量は、サンプルを過剰の0.100NのNaOHと反応させ、そして0.100NのHClによってpH7.5の終点まで逆滴定することによって、測定した。結果は表に列挙した。

表III

直接酸化実験のまとめ

Rec 酸,		成 分, g						
Ex.	RUN #	フィブリル	NaClO ₃	cc	H ₂ SO ₄	時間(h)	洗浄 pH	重量
		meq/g						
11A	168-30	10.0	8.68	450	24	5.7		
10.0	0.78							
11B	168-36	12.0	13.9	600	24	5.9		
13.7	0.75							

実施例 15

硝酸を使用しての

カルボン酸で官能化されたフィブリルの製造

フィブリルの秤量した試料を、頭上攪拌機と水コンデンサーを装着した丸底で多口のくぼみ付きの反応フラスコの中で、適切な強さの硝酸によってスラリ化した。絶えず攪拌しながら、温度を調節し、そして反応を特定された時間行った。酸の強度に関係なく、温度が70℃を越えた後に短時間の間、褐色の煙が遊離した。反応後、砕いた氷の上にスラリを注ぎ、そしてDI水で希釈した。スラリを濾過し、そして過剰の酸をソックスレー抽出器で洗浄することによって除去するのであるが、溜めを数時間毎に新鮮DI水で置き換えることを、スラリ化された試料がDI水からのPhに変化を与えなくなるまで行った。フィブリルを5" 真空で100℃で一晩乾燥した。フィブリルの一部の秤量を標準の0.100NのNaOHと反応させ、そして0.100NのHClによる逆滴定によってカルボン酸含量を測定した。表面酸素含量はXPSによって測定した。水への分散性は0.1重量%において、ワーリング ブレンダーの中で最高2分混合することによって試験した。結果は表4にまとめた。

表IV

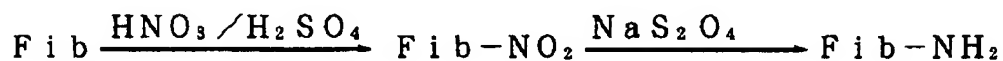
直接酸化実験のまとめ

分散性	成分						COOH	ESCA, at%	at%
	g	cc							
Bx.	フィブリル	酸	酸濃度	温度℃	時間	重量損失	meq/g	C	O
<u>H₂O</u>									
12A	1(BN)	300	70%	室温	24 hr	0	<0.1	98	2
P									
12B	1(BN)	300	15	還流	48	<5%	<0.1	分析せず	
P									
12C	20(BN)	1.0 l	70	還流	7	25%	0.8	分析せず	
G									
12D	48(BN)	1.0 l	70	還流	7	20%	0.9	分析せず	
G									

P=悪い G=良い

6. フィブリルのアミノ官能化

アミノ基をグラファイト性フィブリルに直接導入することは、下記の式に従って、フィブリルを硝酸と硫酸で処理して硝酸化フィブリルを得てから、この硝酸化された形態をジチオン酸ナトリウムのような還元剤で還元してアミノ官能化されたフィブリルを得ることによって、可能である：



得られたフィブリルは、タンパク質（例えば、酵素および抗体）の固定化や、アフィニティ及びイオン交換クロマトグラフィーを包含する多数の有用性を有する。

実施例 16 硝酸を使用しての

アミノ官能化されたフィブリルの製造

水 (1.6 ml) と酢酸 (0.8 ml) の中のフィブリル (70 mg) の冷却懸濁物 (0℃) に、硝酸 (0.4 ml) を滴加した。この反応混合物を 0℃ で 15 分攪拌し、室温で更に 1 時間攪拌した。硫酸 (0.4 ml) と塩素酸 (0.4 ml) の混合物をゆっくり加え、室温で 1 時間攪拌した。反応を停止し遠心分離した。水性層を除去し、そしてフィブリルを水で洗浄 (×5) した。残留物を 10% 水酸化ナトリウムで処理 (×3) し、そして水で洗浄 (×5) して硝酸化フィブリルを完成した。

水 (3 ml) と水酸化アンモニウム (2 ml) の中の硝酸化フィブリルの懸濁物に、0℃ でジチオン酸ナトリウム (200 mg) を 3 回にわけて加えた。この反応混合物を室温で 5 分攪拌し、そして 100℃ で 1 時間攪拌した。反応を停止し、0℃ に冷却し、そして pH を酢酸 (pH 4) で調節した。室温で一晩放置した後、懸濁物を濾過し、水 (×10)、メタノール (×5) で洗浄し、そして真空乾燥してアミノフィブリルを与えた。

このアミノ官能化されたフィブリルを試験するために、フィブリルにホースラディッシュ (horseradish) ペルオキシダーゼをカップリングさせた。それから、この HRP をカップリングされたアミノフィブリルを大規模に透析した。透析の後に、フィブリルをその翌週の間 15 回洗浄した。この酵素で修飾されたフィブリルは次の通り検定された：



結果は Fib-NH₂ に結合された HRP が 1 週間にわたって保持される良好な酵素活性を示したことを表している。

7. ラジカル開始剤を使用しての末端アルコールの結合

カーボンナノチューブの高度の安定性は、過酷な環境でを使用することを可能にする一方で、更なる修飾のために活性化することを難しくさせている。従来の方は過酷な酸化剤と酸の使用を伴っていた。驚くべきことに、過酸化ベンゾイル (BPO) のようなラジカル開始剤を使用してカーボンナノチューブに末端アルコールを結合できることが判明した。式 RCH_2OH (式中、R は水素、ア

ルキル、アリール、シクロアルキル、アラルキル、シクロアリール、またはポリ（アルキルエーテル）である）を有するアルコールに、カーボンナノチューブをラジカル開始剤と共に加え、そして約60℃～約90℃に加熱する。好ましいアルコールにはエタノールおよびメタノールが含まれる。ラジカル開始剤の全部が分解するのに十分な時間が経過したときに、反応混合物を濾過し、そしてカーボンナノチューブ材料を洗浄し乾燥して、式 $\text{ナノチューブ}-\text{CH}(\text{R})\text{OH}$ の修飾されたナノチューブを生じる。この方法は二官能性アルコールを結合させるのにも使用できる。これは一端がカーボンナノチューブに連結すること及び他端が別の材料を表面に間接的に連結するのに使用されることを可能にする。

実施例 17

過酸化ベンゾイルを使用しての

アルコール官能化されたナノチューブの製造

0.277 g のカーボンナノチューブを Me OH の中にプローブ超音波装置を使用して分散させた。0.126 g の BPO を室温で加え、そして温度を 60℃ に上げ、そして追加の 0.128 g の BPO を加えた。60℃ で更に 45 分の後に、0.129 g の最終 BPO 添加を行い、そして混合物を 60℃ に更に 30 分保った。生成物を膜上で濾過し、そして Me OH と Et OH で数回洗浄し、そして 90℃ のオープンで乾燥した。収量は 0.285 g であった。E S C A 分析は 2.5 原子% の酸素含量を示し、これに比べて、BPO 無しで Me OH の中で還流した対照試料では 0.74 原子% であった。

実施例 18

過酸化ベンゾイルを使用しての

ポリ（エチレングリコール）によるカーボンナノチューブの修飾

0.1 g のカーボンナノチューブと、0.5 g の BPO と、10 g のポリ（エチレングリコール）（平均分子量 1000）（PEG-1000）を室温で混ぜ合わせた。この混合物を 90℃ に加熱して PEG を溶解し、そして 90℃ で反応させるために一晩置いた。混合物全体を濾過し、そして洗浄して過剰 PEG を除去し、それから乾燥した。得られた材料はそのまま使用することもできるし、又は PEG の自由端に関心のある材料を結合させることによって更に修飾されるこ

とも可能である。

実施例 19

PEGで修飾されたカーボンナノチューブの 非特異結合を低下させるための用途

高い表面積のカーボン材料への非特異結合は至る所にある。カーボンナノチューブにPEGのような親水性オリゴマーを結合させると非特異結合を低下させることができることが判明した。また、ナノチューブの表面にPEGのような鎖状分子の一端を結合させることによって、自由端は関心のある他の材料の結合のために使用できる官能基を含有することができ、それでいて非特異結合を低下させるためにPEG（又は他の材料）層の性質をなお維持する、ことも判明した。

PEG修飾フィブリルによるウシ血清アルブミンの非特異結合の低下

各々の1.0mgを10mlの緩衝液の中に超音波処理によって分散させることによって、未修飾フィブリル、塩素酸塩酸化フィブリル、及びPEG修飾フィブリルの、pH7.0の50mMのリン酸カリウム緩衝液中の0.1mg/mlのストック分散物を製造した。各々の一連の2倍希釈物の2mlを、9つのポリプロピレン管の各々に入れた。同じ緩衝液中のウシ血清アルブミン（BSA）の0.2mg/mlの溶液の100μlを各管に、及び3つの緩衝液ブランクに加えた。タンパク質を含有しない3つの緩衝液の管もつくった。どの管もボルテックスミキサーで混合し、そして10分毎に30秒ボルテックスしながら30分間インキュベートした。全ての管を遠心器にかけてフィブリルを分離し、そして上澄みの1mlのアリコート新しい管に移し、そしてマイクロ(Micro)BCAプロテインアッセイ（ピアス（Pierce））を使用して全タンパク質含量について分析した。上澄みの中に残っているタンパク質のレベルはフィブリルに非特異に結合した量の間接測定であった。PEG修飾フィブリルでは全部のBSAが上澄みの中に残ったが、未修飾または塩素酸塩酸化フィブリルにはほぼ完全に結合した（図1参照）。

過酸化ベンゾイルを使用して製造されたPEG修飾フィブリルによる非特異結合の低下とNHSエステルカップリングによる非特異結合の低下の比較

塩素酸塩で酸化されたフィブリル、過酸化ベンゾイルを使用してPEGによって修飾されたフィブリル、及びNHSエステルカップリングによってPEGで修

飾された塩素酸塩酸化フィブリルのストック分散物を、pH 7.0、50mMのリン酸カリウム緩衝液の中の1.0mg/mlで、超音波処理により製造した。各々の一連の3倍希釈物の2mlを、7つのポリプロピレン管の各々に入れた。同じ緩衝液の中のβ-ラクトグロブリン(βLG)の0.2mg/mlの溶液の100μlを各管に、及び3つの緩衝液ブランクに加えた。タンパク質を含有しない3つの緩衝液の管もつくった。どの管もボルテックスミキサーで混合し、そして10分毎に30秒ボルテックスしながら60分間インキュベートした。全ての管を遠心器にかけてフィブリルを分離し、そして上澄みの1mlのアリコート 新しい管に移し、そしてマイクロBCAプロテインアッセイ(ピアス)を使用して全タンパク質含量について分析した。上澄みの中に残っているタンパク質のレベルはタンパク質に非特異に結合した量の間接測定であった(図2参照)。管の各々について、βLGはNHSエステルのルートを通してPEGによって修飾されたフィブリルの上澄みの中に残っており、非特異結合がないことを意味した。BPOルートを通してPEGによって修飾されたフィブリルは1.0mg/mlの最も高いフィブリルのレベルにおいてβLGの僅かだけ(約10%)の結合を示し、そしてもっと低いレベルでは有意な結合を示さなかった。対照的に、塩素酸塩で酸化されたフィブリルに対しては0.1mg/ml以上のレベルでほぼ完全に結合し、そして実質的結合はこれらフィブリルの0.01mg/mlまでみられた。

8. 官能化されたナノチューブの二次誘導体

カルボン酸で官能化されたナノチューブ

カルボン酸から製造できる二次誘導体の数は本質的に無限である。アルコール又はアミンは酸に容易に連結して適するエステル又はアミドを与える。アルコール又はアミンがジ-又は二官能性、多官能性の分子の一部である場合には、O-又はNH-を通しての連結は他の官能基を垂下基として放出する。二次試薬の代表的な例は次のものである：

一般式

HO-R、Rはアルキル、
アラルキル、アリール、

垂下基

R-

例

メタノール、フェノール、
トリフルオロカーボン、

フルオロエタノール、 ポリマー、 SiR'_3 $\text{H}_2\text{N}-\text{R}$ Rは上記に同じ	R-	OH末端ポリエステル、 シラノール アミン、アリニン、 フッ素化アミン、 シリルアミン、アミン 末端ポタアミド、 タンパク質
$\text{Cl}-\text{SiR}_3$ $\text{HO}-\text{R}-\text{OH}$ 、 Rはアルキル、 アラルキル、 $\text{CH}_2\text{O}-$ $\text{H}_2\text{N}-\text{R}-\text{NH}_2$ Rはアルキル、アラルキル $\text{X}-\text{R}-\text{Y}$ 、Rはアルキル等； Y- XはOH又は NH_2 ； YはSH、 $\text{C}=\text{N}-\text{C}=\text{O}$ 、 CHO、アルケン、アルキン、 芳香族、ヘテロ環	SiR_3- HO- $\text{H}_2\text{N}-$ Y-	シクロシラン エチレングリコール、PEG、 ペンタエリトリトール、 ビスフェノールA エチレンジアミン、 ポリエチレンアミン ポリアミンアミド、 メルカプトエタノール

反応はカルボン酸をアルコール又はアミンでエステル化又はアミノ化するために開発された方法のいずれかを使用して行うことができる。これらの中でも、エ

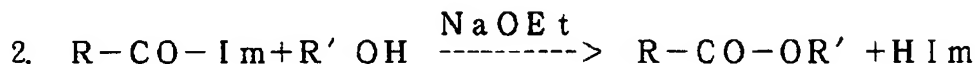
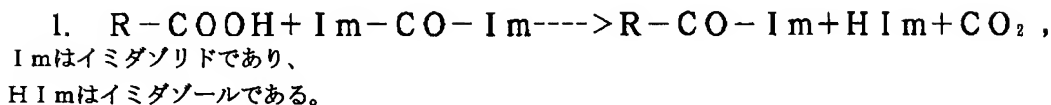
ステル又はアミドのためにアシル化剤としてN, N'-カルボニルジイミダゾール (CDI) を使用する、H. A. スタップの方法 (H.A. Staab, Angew. Chem. Internat. Edit., (1) 351 (1962)) ; およびアミド化のためのカルボン酸を活性化するためにN-ビトロキシスクシンイミド (NHS) を使用するアンダーソンらの方法 (Anderson, et al., J. Amer. Chem. Soc., 86, 1839 (1964)) が使用された。

実施例 20

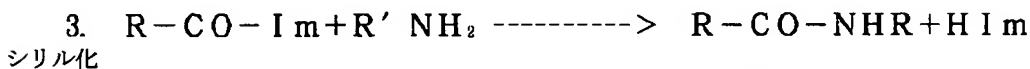
官能化されたフィブリルの二次誘導体の製造

N, N' -カルボニルジイミダゾール

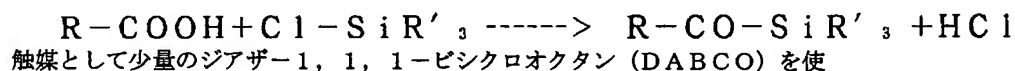
この手順には清浄な乾燥した非プロトン性溶媒（例えば、トルエン又はジオキサン）が要求された。試薬の化学量論量で十分であった。エステルのためには、カルボン酸化合物を不活性雰囲気（アルゴン）の中でトルエン中で、トルエンに溶解したCDIの化学量論量と室温で2時間反応させた。この時間中に、CO₂が発生した。2時間後に、アルコールを触媒量のNaエトキシドと共に加え、そして反応を80℃で4時間継続した。n-アルコールでは、収量は定量的であった。反応は次の通りである：



アミンのアミド化はRTでは触媒されないことが起こる。この手順の中の第一工程が同じである。CO₂の発生後に、化学量論量のアミンをRTで加え、そして1～2時間反応させた。反応は定量的であった。反応は次の通りである：



トリアルキルシリルクロライド又はトリアルキルシラノールは活性水素とは直ちに次の通り反応する：

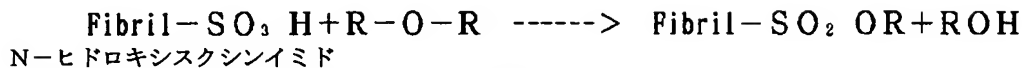


用した。適する溶媒はジオキサンとトルエンであった。

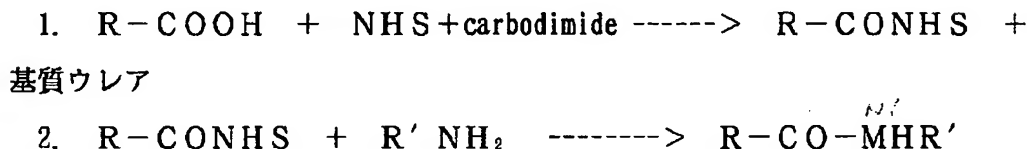
スルホン酸で官能化されたフィブリル

実施例1で製造したようなアリアルスルホン酸は二次誘導体を生成するために更に反応することができる。スルホン酸をLiAlH₄またはトリフェニルホスフィンとヨウ素の組合せによってメルカプタンに還元することができる (March, J. P., p. 1107)。それはまた、ジアルキルエーテルとの反応によってス

ルホン酸エステルに転化できる、すなわち、次の通りである：



第一アミンによるアミド化のためのカルボン酸の活性化はN-ヒドロキシスクシンアミルエステルを通して起こる；カルボジイミドは置換ウレアとして放出される水と結合するために使用される。それから、NHSエステルはRTで第一アミンとの反応によってアミドに転化される。反応は次の通りである：



この方法はタンパク質の側鎖上の遊離NH₂を通してグラファイト性フィブリルにタンパク質を共有結合させるのに特に有効である。この方法によってフィブリルに固定化できるタンパク質の例はトリシン、ストレプトアビジン、及びアビジンを包含する。ストレプトアビジン（又はアビジン）フィブリルはビオチン化された物質（biotinylated substance）のための固体担体を提供する。

実施例 2 1

タンパク質をNHSエステルを通してフィブリルに共有結合

タンパク質がNHSエステルを通してフィブリルに共有結合することができることを実証するために、ストレプトアビジン、アビジン及びトリプシンをフィブリルに次の通り結合させた。

0. 5mgのNHS-エステル フィブリルを、5mMの磷酸ナトリウム緩衝液（pH 7. 1）で洗浄し、そして上澄みを捨てた。200 μlのストレプトアビジン溶液（同じ緩衝液中の1. 5mg）をフィブリルに添加し、そして混合物を

室温で5. 5時間回転させた。それから、フィブリルを1mlの下記緩衝液で順番に洗浄した：5mMの磷酸ナトリウム（pH 7. 1）、PBS（0. 1Mの磷酸ナトリウム、0. 15MのNaCl、pH 7. 4）、ORIGEN™アッセイ緩衝液（IGEN, Inc., Gaithersburg, MD）およびPBS。ストレプトアビジンフィブ

リルは更に使用するためにPBS緩衝液中に貯蔵した。

2. 25mgのNHS-エステル フィブリルを500 μ lの5mMの磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.1) の中で40分超音波処理し、そして上澄みを捨てた。フィブリルを500 μ lの5mMの磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.1) の中で超音波処理し、そして2mgのアビジン (シグマ、A-9390) を含有する同じ緩衝液中でつくったアビジン溶液の300 μ lを加えた。この混合物を室温で2時間回転させ、40℃で一晩貯蔵し、そして室温で更に1時間回転させた。フィブリルを1mlの5mMの磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.1) で4回、そしてPBS緩衝液で2回洗浄した。アビジン フィブリルを貯蔵するために200 μ lのPBS緩衝液中に懸濁させた。

トリプシン フィブリルは、1. 1mgのNHS-エステル フィブリル (アビジン フィブリルに比べると同じように処理した) と、5mMの磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.1) 中でつくった1.06mMのトリプシン溶液の200 μ lとを混合し、そして室温で6.5時間回転させることによって製造された。それから、トリプシン フィブリルを1mlの5mMの磷酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.1) で3回洗浄し、そして貯蔵のために400 μ lの同じ緩衝液の中に懸濁した。

実施例 2 2

フィブリル上のトリプシンの酵素活性度の測定

トリプシンは基質L-BAPNA (N_α -ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリン) と反応することができ、そして410nmの光を吸収する着色化合物を放出した。この反応のためのアッセイ緩衝液は、0.05Mのトリス、0.02MのCaCl₂、pH 8.2であった。反応は1mlの浅鉢の中で、5 μ lのL-BAPNAストック溶液 (H₂O中の37%DMSOの中の50mM) とアッセイ緩衝液1ml中の10~25 μ gのトリプシン フィブリルを混合することによって行った。410nmにおける吸光度低下を10分間モニターした。それから、

酵素活性度 (μ M/分) を初期勾配から算出した。

共有結合したトリプシン フィブリルについては、活性度は13 μ gのフィブリル当たり5.24 μ M/分であった。この結果は、アッセイ条件下で1 μ Mのトリ

ブシン当り $4.6 \mu\text{M}$ /分であると測定されたトリブシン溶液の既知濃度の活性度を割ることによって、フィブリル上の活性トリブシンの量に変換することができる。従って、フィブリル 1 g 当りの活性トリブシンの量は $8.3 \mu\text{mol}$ (又は 19.5 mg) であった。

実施例 2 3

表面チオールを有するカーボンナノチューブ

実施例 2 7 (下記) に記載されているようにエチレンジアオンによる修飾によって製造されたアミノカーボンナノチューブ (CN) の 0.112 g を、 50 mM の EDTA を含有する $\text{pH } 8.0$ の 0.05 M の磷酸ナトリウム緩衝液の 20 ml の中に懸濁させた。この懸濁物をブランソン (Branson) 450 ワット プローブ超音波装置で 5 分超音波処理して CN を分散させた。得られた懸濁物は全く粘稠であった。攪拌しながら、懸濁物の中にアルゴンを 30 分吹き込んだ。 50 mg の 2-イミノチオラン塩酸塩を加え、そして混合物をアルゴン下で連続攪拌しながら 70 分反応させた。得られた材料をポリカーボネート膜フィルターで濾過し、緩衝液で 2 回、DI 水で 1 回、そして無水 EtOH で 2 回洗浄し、その全てをアルゴンブラケット下で行った。このチオール修飾された CN を真空デシケーターの中に入れ、そして一晩吸排気した。最終重量は 0.118 g であり、重量増加に基づいて 55% の転化率であった。

チオール化されたナノチューブの 10 mg の試料を 10 ml の DI 水の中に超音波処理で懸濁させ、そして $0.45 \mu\text{m}$ のナイロン膜で濾過してフェルト状マットを生成した。マット部分を真空デシケーターの中に貯蔵した後に ESCA によって分析し、それは 0.46% の緩衝液と 1.69% の窒素を示し、チオール修飾 CN への成功した転化が確認された。

実施例 2 4

チオール修飾されたカーボンナノチューブを金表面に結合

金箔 (アルファ/エーサル (Alfa/Aesar)) $2 \text{ cm} \times 0.8 \text{ cm}$ を、1 部の 30% 過

酸化水素と 3 部の濃硫酸の溶液で 10 分間清浄にし、そして脱イオン水で洗った。箔片を金の導線に接続し、そしてサイクリック ボルタモグラムが約 10 分間

変化しなくなるまで1Mの硫酸の中で $-0.35\text{ V vs. Ag/AgCl}$ から $-1.45\text{ V vs. Ag/AgCl}$ までの間で電気化学的に循環させた。それから、脱イオン水で洗い、そして乾燥した。大きな片を4つの $0.5\text{ cm} \times 0.8\text{ cm}$ の小片に裁断した。

アルゴンで30分間バージすることによって脱酸素化した無水EtOHの10 mlを、2つのガラス壺の各々に入れた。一つの壺の中に16 mgのチオール修飾CN (CN/SH) と2片のAuを、そして他方の壺の中に1片のAuと、チオール誘導体をつくるために使用したエチレンジアミン修飾CNの10 mgを懸濁させた。全ての操作はAr充填グローブバッグの中に行った。壺をAr下で密封し、そして冷却した超音波浴の中に1時間入れた。密封壺をRTで72時間放置した。壺からAu試料を取り出し、EtOHで3回洗浄し、自然乾燥し、そして保護壺の中に入れた。

CN/エチレンジアミンおよびCN/SHに曝されたAu箔試料を、走査電子顕微鏡 (SEM) によって検査して表面上のCNの有無を調べた。 $40,000\times$ での検査はCN/SHに曝された表面上に分布されたCNの存在を示したが、CN/エチレンジアミンに曝されたAu箔試料ではCNが観察されなかった。

実施例 25

アミノフィブリルからマレイミドフィブリルを製造

アミノフィブリルは実施例 13 に従って製造した。それから、アミノフィブリル (62.2 mg) をリン酸ナトリウム緩衝液 (5 ml, pH 7.2 で 5 mM) の中で超音波処理した。このフィブリル懸濁物に、スルホスクシンミジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (SMCC; 28.8 mg, 0.66 ミリモル; ピアス、触媒 No. 22360) を加えた。この反応混合物を室温で一晩攪拌した。フィブリルを水とメタノールで洗浄し、そして生成物フィブリルを真空乾燥した。この生成物上での抗体固定化はマレイミドフィブリルの存在を確認した。異なるリンカーを有する他のマレイミド (たとえば、スルホ-SMCC、4- [p-マレイミドフェニル] 酪酸スクシンイミジル [S

MPB]、スルホ-SMPB、m-マレイミドベンジル-N-ヒドロキシスクシ

ンイミドエステル〔MBS〕、スルホーMBS、等々）フィブリルは、同じ方法を通して製造できる。

得られたマレイミド フィブリルはタンパク質、例えば、抗体および酵素、の共有結合固定化のための固体支持体として使用できる。抗体はマレイミドで活性化されたフィブリルの上に共有結合で固定化された。抗体の容量は硝酸化／還元法（実施例13）から得られたアミノフィブリルを使用した場合にはフィブリル1 g 当り1.84 mgであった、そしてカルボキシルフィブリルから誘導されたアミノフィブリルを使用した場合にはフィブリル1 g 当り0.875 mgであった。

実施例 2 6

カルボン酸で官能化されたフィブリルからの エステル／アルコール誘導体の製造

カルボン酸で官能化されたフィブリルを実施例14のように製造した。カルボン酸含有量は0.75 meq/g であった。室温で溶媒としてトルエンを使用して不活性雰囲気中でフィブリルと化学量論量のCDIとの反応をCO₂の発生が止むまで行った。その後で、このスラリーを80℃で10倍モル過剰のポリエチレングリコール（分子量600）と触媒としての少量のNaOEtをもって反応させた。2時間反応後、フィブリルを濾過によって分離し、トルエンで洗浄し、そして100℃で乾燥した。

実施例 2 7

カルボン酸で官能化されたフィブリル（177-041-1） からのアミド／アミン誘導体の製造

セラムストッパー（serum stopper）を装着した100mlのRBフラスコの中で攪拌しながら20mlの無水ジオキサンの中に、0.242 gの、塩素酸塩で酸化されたフィブリル（0.62 meq/g）を懸濁させた。20倍モル過剰のN-ヒドロキシスクシンイミド（0.299 g）を加え溶解させた。これに続いて、20倍モル過剰の1-エチル-2-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDAC）（0.510 g）を加え、そして攪拌を室温で2時間継続した。この後に、攪拌を止め、上澄みを吸引し、そして固定を無水ジオキサンと

MeOHで洗浄し、そして0.45 μ のポリスルホン膜で濾過した。濾膜上で固体を更にMeOHで洗浄し、そして真空乾燥を重量低下が観察されなくなるまで行った。NHSで活性化された酸化フィブリルの収率は観察された6%増量に基づいて100%であった。

100 μ lのエチレンジアミン(en)を10mlの0.2MのNaHCO₃の緩衝液の中に加えた。等容量の酢酸(HOAc)を加えてpHを8近くに維持した。激しく攪拌しながら、NHSで活性化された酸化フィブリル(0.310 g)を加え、そして1時間反応させた。追加の300 μ lのenと300 μ lのHOAcを更に10分間で加えた。溶液を0.45 μ ポリスルホン膜で濾過し、NaHCO₃緩衝液、1%のHCl、DI水およびEtOHで順に洗浄した。固体を一晩真空乾燥した。このHCl塩を更なる分析および反応のためにNaOHとの反応によって遊離アミンに戻した(177-046-1)。

このアミノ化フィブリル(GF/NH₂)の上に存在するNの量を定量化するためにESCAを行った。177-046-1のESCA分析は0.90原子%のNを示した(177-059)。さらに、このNのどれだけの量が、アクセシブルな反応性の基として存在するかを調べるために、利用可能な第一アミン基による対応シッフ塩基結合を生成するためにペンタフルオロベンズアルデヒドとの気相反応によって誘導体を生成した。ESCA分析はなお予想通りの0.91原子%と、1.68原子%のFを示した。これは0.34原子%のNがアミノ化フィブリル上の反応性の第一アミンとして存在するとの解釈になる(ペンタフルオロベンズアルデヒド分子当り5つのF)。0.45原子%のNのレベルは各Nの自由端によって完全反応を引き受けると予想されるであろう。観測されたレベルはNHSで活性化されたフィブリルによるNの反応から非常に高い収率を指標しており、そして利用可能な自由アミン基の反応性を確認している。

ESCAデータから算出された自由アミンとして存在する0.34原子%のNのレベルにおいては、フィブリルは他の材料のカップリングを許す自由アミン基によって殆ど完全な被覆されているのであろう。

カルボキシルフィブリルは、エチレンジアミン(炭素2個のリンカー)ではなく、モノー保護した1,6-ジアミノヘキサン(炭素6個のリンカー)を使用し

てやはりアミノフィブリルに転化された。

実施例 28

カルボン酸で官能化されたフィブリルからの アミン誘導体の製造

フィブリル上のカルボキシル基は、そのカルボキシル基を、2つ又はそれ以上のアミノ基（その少なくとも1つは $t\text{-Boc}$ や SBZ のような基によって保護されていない）を有する化合物の1つのアミノ基と反応させることによって修飾されることができる。そうして生成されたフィブリルはアミド誘導体であり、ここではフィブリルカルボニル基からアミドカルボニルが誘導されており、そしてアミド窒素は一つまたはそれ以上の第一アミノ基を含有する基（例えば、アルキル基）によって置換されている。それから、これらアミノ基は使用のために又は更なる修飾のために利用可能である。

出口をゴムセラム隔膜で完全にとめてある乾燥した焼結ガラス濾過漏斗の中に1gのカーボンフィブリルを入れ、そして無水ジクロロメタンを加えて覆った。N-メチルモルホリン（758 μL 、7ミリモル）を加え、この懸濁物をへの助けで混ぜた。それから、イソブチルクロロホルメート（915 μL 、7ミリモル）を加え、この懸濁物を1時間の間、定期的に混ぜた。混合物は、実用であるほどのパラフィルムのカバーによって大気の湿気から保護した。

その間にN-boc-1, 6-ジアミノヘキサン塩酸塩（1.94g、7.7ミリモル）をジクロロメタン（10mL）と1NのNaOH（10mL）の間に分配した。後者の有機相を無水炭酸カリウムで乾燥し、そして綿栓を有する使い捨てパスツールピペットを通して濾過し、そしてN-メチルモルホリン（758 μL 、7ミリモル）を加えた。

濾過漏斗からセラム隔膜を取り除き、減圧濾過によってフィブリルから試薬を除去し、そしてフィブリルを無水ジクロロメタンで洗浄した。セラム隔膜を再び取り付け、そしてN-メチルモルホリンとモノ保護ジアミノヘキサンの混合物をフィブリルに加えた。混合物を1時間の間、定期的に攪拌した。それから、濾過によって試薬を除去し、そしてフィブリルをジクロロメタン、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順に洗浄した。

トリフロオロ酸とジクロロメタンの50%混合物をフィブリルに加え、そして混合物を20分間定期的に攪拌した。溶媒を濾過によって除去し、そしてフィブリルをジクロロメタン、メタノール、水、0.1M KNaOH、及び水で順に洗浄した。

この方法の効能を実証するために、アミノフィブリルの小さな試料を、アミノ基と特異に反応するように修飾されている「活性化された」ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP; 5mg、ピース) と反応させた。フィブリルは冷たく保ちながら数日間繰り返し洗浄した (懸濁、回転、及びエッペンドルフ管での遠心分離によって)。ほぼ2週間後に、グリシン緩衝液、pH 4.4、の中の H_2O_2 /ABTSによって酵素を検定した。10分以内に溶液に緑色が現れ、それは酵素の存在を意味した。対照フィブリル (活性HRPで処理されており、そして同じ期間の間洗浄した、COOHフィブリル) は何らかの触媒活性が仮にあるとしても殆ど示さなかった。

実施例 29

カルボン酸で官能化されたフィブリルからの シリル誘導体の製造

実施例 14 のように製造した酸官能化フィブリルを不活性雰囲気中でジオキサンの中にスラリ化した。攪拌しながら、化学量論量のクロトリエチルシランを加え、そして0.5時間反応させ、その後、ジオキサン中のDABCOの5%溶液を数滴加えた。この系を更に1時間反応させ、その後にフィブリルを濾過によって回収し、そしてジオキサンの中で洗浄した。フィブリルを5" 真空で100℃で一晩乾燥した。

表5に二次誘導体の製造をまとめた。生成物はESCAにより、C、O、N、SiおよびFの表面含量について分析した。

表V

二次誘導体の製造のまとめ

反 応 体	垂 下 基	ESCA 分 析, 原 子 %					
		S	C	N	O	Si	F
成長 As	----	--	98.5	--	1.5	--	--
塩素酸塩 酸化物	-COOH, C=O, C-OH	--	92.4	--	7.6	--	--
$H_2N-C_2H_4-NH_2$	-CONHC ₂ H ₄ NH ₂	--	99.10	0.90	--	--	--
	-CONHC ₂ H ₄ N=OC ₆ F ₅	--	97.41	0.91	--	--	1.68

実施例 3 0

カルボン酸で官能化されたフィブリンからの
シリル誘導体の製造

実施例 1 4 のように製造した酸官能化フィブリンを不活性雰囲気中でジオキサンの中にスラリー化した。攪拌しながら、化学量論量のクロトリエチルシランを加え、そして 0.5 時間反応させ、その後、ジオキサン中の DABCO の 5 % 溶液を数滴加えた。この系を更に 1 時間反応させ、その後にフィブリンを濾過によって回収し、そしてジオキサンの中で洗浄した。フィブリンを 5" 真空で 100 °C で一晚乾燥した。

表 6 に二次誘導体の製造をまとめた。生成物は ESCA によって分析した。分析は所定の垂下基の導入を確認した。生成物を ESCA によって、C、O、N、Si および F の表面含量について分析した。

表 VI

二次誘導体の製造のまとめ

ESCA 分 析, 原 子 %

反 応 体	垂 下 基	S	C	N	O	Si	F
CF ₃ CH ₂ OH	-COOCH ₂ CF ₃						NOT ANALYZED
PolyEG-600	-CO-(OC ₂ H ₄ O-)H						NOT ANALYZED
HO-C ₂ H ₄ -SH	-COOC ₂ H ₄ SH						
Cl-SiEt ₃	-COSiEt ₃						

実施例 3 1

カルボン酸で官能化されたフィブリンからの

第三及び第四アミン誘導体の製造

第三及び第四アミン官能基はナノチューブ上のカルボキシル基と第三又は第四アミン前駆体のアミン又はヒドロキシルどちらかの基とによるアミド又はエステル結合を通してカーボンナノチューブの表面に結合させることができる。かかる第三又は第四アミンフィブリンは生体触媒を分離するためのクロマトグラフィー用マトリックスとして有効である。第三又は第四アミンフィブリンはディスク形状のマットに加工することができるし、又は分離のための通常のクロマトグラフィー用媒体（例えば、アガロース）と混合することができる。

トリエチルエタノールアミンヨージド前駆体の製造

100 mlの丸底フラスコの中で10 gのN, N-ジエチルエタノールアミン（85.3ミリモル）を10 mlの無水メタノールと混合した。それから、20 gのヨウ化エチル（127.95ミリモル）と10 mlの無水メタノールの混合物をピペットを使用して滴加した。この反応混合物を30分還流した。反応混合物を室温まで放冷したとき、白色の結晶性生成物が形成された。この白色固体生成物を濾過によって集め、そして無水メタノールで洗浄した。さらに、生成物を真空下でデシケーターの中で一晩乾燥させた。33%収率で、生成物（10.3 g、37.7ミリモル）が得られた。

第四アミンで官能化されたグラファイト性フィブリンの製造

真空乾燥した25 mlのウィートン(Wheaton)使い捨てシンチレーション パイ

アルの中で、100mgの乾燥カルボキシルフィブリル（フィブリル1g当り約0.7ミリモルのCOOH）を2mlの無水ジメチルホルムアミドと混合し、この混合物を60秒間超音波処理した。さらに2mlのジメチルホルムアミド、39mgのジメチルアミノピリジン（0.316ミリモル）及び50 μ lのジイソプロピルカルボジイミド（0.316ミリモル）を反応バイアルに加えた。この反応混合物を室温で1時間攪拌し、それから88mgのトリエチルエタノールアミンヨージド（0.316ml）をバイアルに加え、そして反応を一晩行なった。得られたフィブリルを20mlのジメチルホルムアミドで3回、20mlの塩化メチレンで3回、メタノールで3回、そして最後に脱イオン水で3回洗浄した。生成物を真空乾燥した。窒素の元素分析からの結果はフィブリル上のカルボキシル基の約50%が第四アミン成分の中の第一アミノ基と反応していたことを示した。

実施例32

第四アミン官能化グラファイト性フィブリル上での ウシ血清アルブミン（BSA）のクロマトグラフィー

60mgの、2-ジエチルアミノエチルアミンで修飾されたカルボキシルフィブリルと180gのセフェデックス（Sephadex）G-25スーパーファイン樹脂（ファルマシア（Pharmacia）、スウェーデン、ウプサラ在）とを含有する水性スラリーを室温で一晩放置して固体支持体の完全な水和を確実にした。このスラリーを1cm \times 3.5cmのカラムに充填した。カラムを5mMの磷酸ナトリウム緩衝液（pH7.3）の流速0.2ml/分によって平衡にした。カラムにBSA（0.6mg、脱イオン水0.1mlの中）を装填した。カラムを5mMの磷酸ナトリウムの流速0.2ml/分によって溶出させ、そして0.6mlの分画を集めた。溶出プロフィールはUV-可視検出器を使用してモニターし、そして図3に示した。検出器がカラムからタンパク質がこれ以上溶出されないことを示したら、5mMの磷酸ナトリウム（pH7.3）の中の1M KClを加えることによって結合BSAを溶出させた。各分画の中のタンパク質の存在はマクイロBCAアッセイ（ピアス、イリノイ州ロックフォード在）により同定した。

実施例33

第四アミン官能化グラファイト性フィブリル上での ウシ血清アルブミン (BSA) のクロマトグラフィー

100mgの、2-(2-トリエチルアミノエトキシ) エタノールで修飾されたカルボキシルフィブリルと300gのセフェデックスG-25スーパーファイン樹脂とを含有する水性スラリーを室温で一晩放置した。得られたスラリーを直径1cmのカラムに充填した。カラムを流速0.1~0.6ml/分の5mMの磷酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)で平衡にした。カラムにBSA(2.7mg、脱イオン水0.2mlの中で)を装填した。カラムを5mMの磷酸ナトリウムの流速0.2ml/分によって溶出させ、そして0.6mlの分画をを集めた。溶出プロファイルはUV-可視検出器を使用してモニターした(図4)。検出器が5mMの磷酸ナトリウム緩衝液ではもはやタンパク質がカラムから溶出されないことを示したら、溶媒を5mMの磷酸ナトリウム(pH7.3)の中の1MのKClに変更した。各分画の中のタンパク質の存在はマクイロBCAアッセイ(ピアス、イリノイ州ロックフォード在)により同定した。

9. グラファイト性カーボンの酵素的官能化

グラファイト性カーボン、特に、カーボン ナノチューブ、の表面に官能基を導入するのに生体触媒を使用できる。今までは、グラファイト性カーボンは純粋に化学的手段(例えば、1994年12月8日に出願された米国特許出願第08/352,400号を参照)によって修飾されていた。これら化学的方法は次のような欠点を有する；(1)過酷な条件(極端の温度、極端な活性度または有毒な化学物質の使用)、および(2)特異性の欠如(たとえば、酸化がCOOH、CPH、およびCHOの基を導入する)。固体グラファイト性カーボン(たとえば、カーボンフィブリル；ハイパーイオン社)の水性懸濁物は、グラファイト性カーボンを基質として受け入れることができそして化学的に修飾されたグラファイト性カーボンをもたらす化学反応を行うことができる一つまたはそれ以上の酵素を含有して製造される。水性懸濁物は酵素(単数または複数)がグラファイト性カーボンの表面を触媒的に修飾するのに十分な時間酵素(単数または複数)が反応を行うために許容できる条件(温度、pH、塩濃度、等々)に維持される。

反応中、酵素（単数または複数）がグラファイト性カーボンの表面に接近することを可能にするために懸濁物は連続混合される。反応が満足な度合いに進行するために許容できる反応時間の後に、酵素は濾過洗浄によってカーボンから除去される。

今日迄は、2つのタイプの酵素が使用されてきた：チトクロム p 4 5 0 酵素とペルオキシダーゼ酵素。両方の場合とも、酵素のタイプが十分研究されており、それらは芳香族のタイプの基質を許容し、そしてそれらの最適反応条件は研究されている。どちらの酵素のタイプもヒドロキシル基をそれらの基質の中に導入する；そしてヒドロキシル基をグラファイト性カーボンの中に導入するであろう。酵素の外に、その他の生体触媒、例えば、リボザイムおよび触媒的抗体、または酵素の非生物学的擬態はカーボンナノチューブを触媒的に官能化するように設計されることができはすである。

実施例 3 4

ラット肝ミクロソームを使用しての酵素的官能化

チトクロム p 4 5 0 酵素は肝臓の中で解毒剤として機能すると一般に考えられている (F. Peter Guengerich, American Scientist, 81, 440-447 及び F. Peter Guengerich, J. Biol. Chem., 266, 10019-10022)。それらはポリ芳香族毒性化合物のような外来化合物をヒドロキシル化する。ヒドロキシル化はこれら化合物が尿によって体から消えることができるように水溶性になることを可能にする。肝臓には多数の様々なチトクロム p 4 5 0 酵素が存在し、各々が異なる基質特異性を有する。これらの広い範囲の特異性は解毒を要求する環境毒素の範囲が広いので重要であると考えられる。個々のチトクロム p 4 5 0 s は商業的に入手可能であるが、そのいずれかがカーボンナノチューブを基質として受け入れるかどうかに関しての情報は入手可能でない。この不確かさ故に、本発明者らは最初にカーボンナノチューブを、多数の異なるチトクロム p 4 5 0 s を含有したラット肝抽出物と一緒にインキュベートすることに決めた。

2体のラット（「実験用」ラット）にはチトクロム p 4 5 0 酵素の発現を誘発させるために、それらの飲料水中でフェノバピタール（1 g/L、pH 7.0）を1週間投与した。別の2体のラット（「対照」ラット）には、フェノバピター

ルを含まない水を与えた。それから、ラットを犠牲にして、それらの肝臓から標準手順（例えば、次の文献を参照：Methods in Enzymology, Vol, 206）によってチトクロム p 450 s を含有するミクロソームを調製した。

ミクロソームをカーボンナノチューブ（フィブリル）と混合してチトクロム p 450 s をグラファイト性カーボンと反応させた。この実験では、0.1 M のトリリス、1.0 mM の NADPH、0.01 % の NaN_3 、1.0 mM のグルコース-6-ホスフェート、グルコース-6-ホスフェート デヒドロゲナーゼ（1 ユニット/mL）、pH 7.4、を含有する、緩衝剤で処理済みの溶液の中で、5 mg のフィブリル（「プレーン」即ち非官能化フィブリルと「COOH」即ち酸化フィブリルの両方）をミクロソーム（実験用と対照の両方のミクロソーム）と混合した。NADPH はチトクロム p 450 s のための補基質として包含されており、グルコース-6-ホスフェート、グルコース-6-ホスフェート デヒドロゲナーゼは、（ NADP^+ がチトクロム p 450 s によって生成された場合に） NADP^+ から NADPH を再生するために添加された。混合物をマイクロ遠心管の中で室温で約 1.5 日回転させた。インキュベーション後、フィブリルを脱イオン水、1 M の HCl、1 M の NaOH、0.05 % のトリトン（Triton）X-100、0.05 % のツイーン（Tween）、メタノール、及び 1 M の NaCl で手広く洗浄した。洗浄後、タンパク質用のマイクロ BSA アッセイ（ピアス）はフィブリルがそれと組み合わせられたタンパク質をなお有しているらしいことを示した（しかし、洗浄液にはタンパク質が検出されなかった）。

ヒドロキシル基がフィブリル表面上に導入されたのかどうかを測定するためにフィブリルを N-FMOC-イソロイシンと反応させた。異なるバッチのフィブリル（対照と実験用）（各々 1.5 mg）を、4.45 mg/mL の FMOC-イソロイシン、1.54 mg/mL のジメチルアミノピリジン（DMAP）及び 2.6 mg/mL の 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）を含有する乾燥 DMF の溶液の 333 マイクロリットルと反応させた。（連続回転させながらの）2 日間の反応後に、フィブリルを DMF、ピペリジン、ソタノール、水、DMF、メタノール、塩化メチレン（各 600 μL ）で洗浄した。この洗浄順序を 3 回繰り返した。存在したイソロイシンに関するアミノ酸分析のために、フィブリルをガ

ルブレイス研究所 (Galbraith Laboratories) (テネシー州ノックスビル(Knoxville) 在) に送った。結果はイソロイシンの外に他の多数のアミノ酸が見られたのではっきりせず、それはラット肝ミクロソーム抽出物の中に存在したタンパク質、ペプチド、及びアミノ酸がフィブリルから完全には洗い去られなかったことを意味する。従って、洗浄および分析における技術的難しさ故に、チトクロム p 450s がフィブリルを官能化したのかどうかを決定することができなかった。

実施例 35

商業的に入手可能な組換えチトクロム p 450 酵素を 使用してのフィブリルの官能化

チトクロム p 450s 源としてラット肝ミクロソームを使用することに関連した不純物を避けるために、個々のチトクロム p 450 酵素を購入した (ジェンテスト (GENTEST)、MA 州ホバーン (Woburn) 在)。チトクロム p 450 酵素は膜との関連で活性であるに過ぎないので、これら酵素はミクロソーム調製物として供給される。上記のものに似た反応手順を使用して、本発明者らは次のチトクロム p 450s を試験した: CYP1A1 (触媒 #M111b)、CYP1A2 (触媒 #M103c)、CYP2B6 (触媒 #M110a)、CYP3A4 (レダクターゼを含む、触媒 #M107r)。反応溶液には MgCl_2 (0.67 mg/mL) も包含された。この実験では、フィブリルはソックスレー装置の助けをもって洗浄した。

導入されたヒドロキシル基の分析は、チトクロム p 450 と反応し洗浄されたフィブリルと着色試薬 3, 5-ジニトロ安息香酸 (DNBA) との反応によって行った。カップリングは N-FMOC-イソロイシンについて上記に説明した通りに行った。DNBA との反応の後に、フィブリルを DMF で洗浄し、そして残留した (共有結合した) DNBA は 6M の HCl 又は 46 ユニット/mL のブタ肝エステラーゼ (シグマ) を使用して加水分解した。解放された DNBA の分析は加水分解処理の後のフィブリルを取り囲んでいる上澄みの HPLC 分析によって行った。解放された DNBA の HPLC 分析は、Vydac C18 逆相分析カラム (触媒 #218TP54) を備えたウォーターズ (Waters) HPLC システ

ムで、そして0.1%のTFAを含有する脱イオン水（溶媒A）から0.1%のTFAを含有するアセトニトリル（溶媒B）までの線状勾配で、行った。

実施例36

ペルオキシダーゼを使用してのフィブリルの官能化

ペルオキシダーゼ基質特異性についての文献記述は、カーボンナノチューブがこれら酵素のための基質であるかも知れないことを包含していた（J.S. Dorick et al., *Biochemistry* (1986), 25, 2946-2951; D.R. Buhler et al., *Arch. Biochem. Biophys.* (1961) 92, 424-437; H.S. Mason, *Advances in Enzymology*, (1957) 19, 79; G.D. Nordblom et al., *Arch. Biochem. Biophys.* (1976) 175, 524-533）。ペルオキシダーゼ（水素ペルオキシダーゼ、タイプII、シグマ）がフィブリルの表面上にヒドロキシル基を導入できるかどうかを測定するために、フィブリル（11mg）を、50mMの酢酸ナトリウムを含有する溶液（1.25mL, pH5.0）の中で、ホースラディッシュ ペルオキシダーゼ（200nM）と混合し、そしてジヒドロキシマル酸（15mg）を、反応の最初の3時間の間に5mgで、加えた。反応は気体酸素を間欠的に吹き込みながら4℃で全体で5時間行った。反応後、フィブリルを水、1NのNaOH、メタノール、及び塩化メチレン（各200mL）で洗浄した。対照反応は熱不活性化されたペルオキシダーゼ（100℃で5分）を使用して行った。

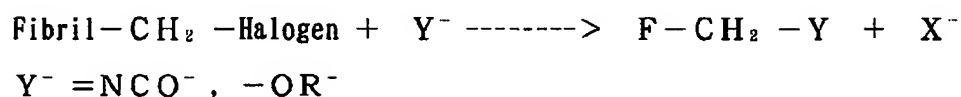
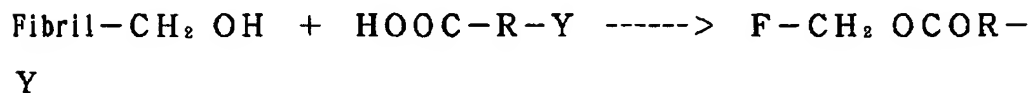
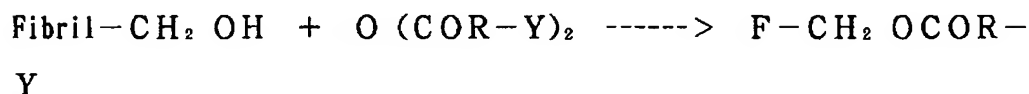
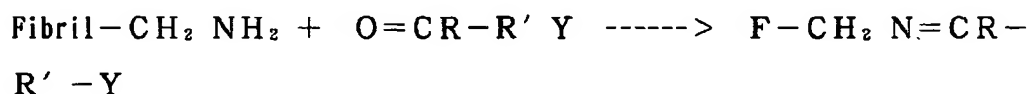
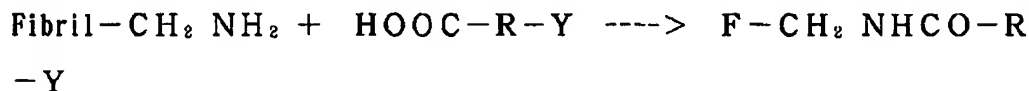
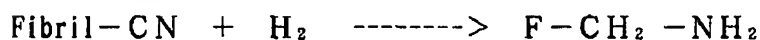
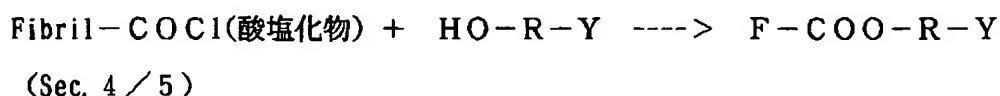
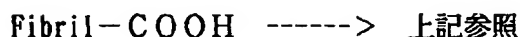
ペルオキシダーゼで触媒されたフィブリルのヒドロキシル化の大きさを分析するために、フィブリルを乾燥DMF中でイミダゾールの存在下でt-ブチルジメチルシリルクロリド（アルドリッチ）と反応させた。フィブリルの洗浄後、フィブリルの中に導入された珪素の元素分析のために、フィブリルをロバートソンミクロリット研究所（Robertson Microlit Laboratories, Inc）（NJ州マジソン）に送った。分析の結果はフィブリルの表面上の珪素の存在についてははっきりしなかった。元素分析のために提出したフィブリルの中の小さなチップの中に、実験に使用したガラス容器からの珪素が存在したと考えられる。これは実験用試料と対照試料の両方において高い珪素レベルをもたらした。実験の結論はペルオキシダーゼはフィブリルの中にヒドロキシル基を導入したであろうというも

のであるが、技術的に難しいために本発明者らは導入されたヒドロキシル基の存在を測定することを妨げられた。

10. 無酸素フィブリル表面への電子親和物付加によって

又は金属化によって官能化されたナノチューブ

活性化した電子親和物を無酸素フィブリル表面に付加することにより得ることができる主な生成物は垂下の $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COCl}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、ハロゲン、または $\text{HC}=\text{O}$ を有する。これらは次の反応によって二次誘導体に転化できる：



11. デンドリマー性ナノチューブ

ナノチューブの表面上の官能基の濃度は、特異官能基の数が各ジェネレーションによって増加してデンドリマー(dendrimer)様の構造を形成する結果になる多官能性試薬の一連のジェネレーションによってナノチューブを修飾することによ

って、増加させることができる。得られたデンドリマー性ナノチューブはそこに

タンパク質を共有結合で固定化するための固体支持体として特に有効である、何故ならば、それらはナノチューブ表面に固定化されたタンパク質の密度を増加させるからである。本発明は特異な化学官能基の高密度は高い表面積の粒状カーボンの表面に与えられることができることを実証し、それは従来の高い表面積のカーボンをもってしては困難であった。

実施例 3 7

リジン系デンドリマーの製造

反応順序は図 5 に示されている。重炭酸ナトリウム (5 ml、0.2 M、pH 8.6) の中のアミノフィブリル (90 mg) の懸濁物に、ジオキサン (5 ml) 中の N_α , N_R -ジ-tert-boc-L-リジン N-ヒドロキシスクシンイミド エステル (120 mg、0.27 ミリモル) の溶液を加えた。この反応混合物を室温で一晩攪拌した。tert-ブトキシカルボニルで保護したリジンフィブリルを、水、メタノール及び塩化メチレンで完全に洗浄し、そして真空乾燥した。それから、tert-ブトキシカルボニルで保護したリジンフィブリルを、塩化メチレン (5 ml) 中のトリフルオロ酢酸 (5 ml) によって室温で 2 時間処理した。生成物アミノリジンフィブリルを塩化メチレン、メタノール及び水で完全に洗浄し、そして真空乾燥した。第二および第三ジェネレーションのリジンフィブリルの製造は同じ手順に従った。アミノ酸分析データは、第一ジェネレーションのリジンフィブリルはフィブリル 1 g 当り 0.6 マイクロモルのリジンを含有し、第二ジェネレーションのリジンフィブリルはフィブリル 1 g 当り 1.8 マイクロモルを含有し、そして第三ジェネレーションのリジンはフィブリル 1 g 当り 3.6 マイクロモルのリジンを有することを示した。

カルボキシル デンドリメリック フィブリルはカルボキシルフィブリルと共にアスパラギン酸又はグリタミン酸を使用することによって同じ方法によって製造することができる。

実施例 3 8

カルボキシレート末端デンドリマーの製造

カーボンナノチューブ (CN) コアを有するカルボキシレート末端デンドリマ

一は、代々の、アミノブチル-ニトリロトリ酢酸 (NTA) の逐次カップリングと、塩素酸塩で酸化されたカーボンフィブリルのNHSエステルによる開始とによって製造できる。

NTAの製造

NTAはホチュリ (Hochuli) の方法 (E. Hochuli, H. Dobeli, and A. Sebacher, J. Chromatography, 411, 177-184 (1987)、その内容は本願明細書中に組み入れられる) に従って製造した。

CN/NHSの製造

CN/NHSは実施例20の方法に従って製造した。

CN/NTAの製造

25mlの0.2Mの NaHCO_3 、pH8.1、の中に、0.4gのNTA-HClを溶解した。pHを7.8までもどすために1NのNaOHを加えた。0.5gのCN/NHSを加え、CNを分散させるために混合物を超音波処理し、得られたスラリーを攪拌しながら30分間反応させた。スラリーを0.45 μm のナイロン膜上で濾過し、そしてフィルター上で、pH8.1の炭酸塩緩衝液で2回、そしてDI水で2回洗浄した。修飾されたCNを25mlのMeOHの中に超音波処理によって2回再懸濁させ、濾過して固体ケーキにし、そして最後に真空デシケーターで乾燥した。

CN/NTA/NTAの製造

CN/NTAをNHS活性エステルにまず転化した。90℃のオーブンの中で0.386gのCN/NTAを30分乾燥し、それから30mlの無水ジオキサンを含有しアルゴンでパージされた100mlのRBフラスコに移した。攪拌しながら0.4gのN-ヒドロキシスクシンイミドを、次いで0.67gのEDCを加え、更に1時間連続攪拌した。この間中、CNは互いに凝集しがちであった。ジオキサンをデカントして捨て、そして固体を20mlの無水ジオキサンで2回洗浄した。固体を20mlの無水MeOHで洗浄し、その間に凝集は壊れた。固体を0.45 μm のナイロン膜で濾過し、MeOHの中に再懸濁させ、濾過し、そしてフィルター上でMeOHによって洗浄した。

0.2gのNTAを50mlのフラスコに入れ、そして1NのNaOHの10滴

で溶解した。20mlの9.2Mの NaHCO_3 、pH8.1、を加え、それから、CN/NTA/NHSの全てを加え、そして溶液をプローブソニケーターで軽く超音波処理した。混合物を室温で2.5時間反応させた。修飾されたCNを0.45 μm のナイロン膜で濾過し、炭酸塩緩衝液で2回洗浄し、DI水の中に超音波処理によって再懸濁させ、濾過し、そしてDI水で洗浄した。それから、それらを真空デシケーターの中に入れて乾燥した。

CN/NTA/NTA/NTAの製造

上記手順に従って、追加のレベルのNTAを付加した。

CN/NTA/NTA/NTA/NTAの製造

上記手順に従って、追加のレベルのNTAを付加した。

NTA付加の4つのジェネレーションの各々の試料(約10mg)を10mlのDI水の中に超音波処理によって懸濁させ、そして0.45 μm のナイロン膜で濾過してフェルト状マットを形成した。マット切片を真空デシケーターの中に貯蔵し、そしてESCAによって窒素(N)について分析してNTAの相対量を示した。結果は下記の表に示す。

材 料	ESCAによるN%
CN/NTA	0
CN/NTA/NTA	1.45
CN/NTA/NTA/NTA	1.87
CN/NTA/NTA/NTA/NTA	2.20

ESCA結果は継続する各ジェネレーションによる増加する量の導入を立証している。

実施例39

タンパク質支持体としてのカーボンナノチューブデンドリマー

カーボンナノチューブの上に固定化されたタンパク質の密度は、デンドリマーを担持するように誘導化されたフィブリルを使用することによって大きく増加し得る。ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を次の方法に従ったデンドリマー性ナノチューブの上に固定化した：

ブレンフィブリル (0.49mg)、アミノフィブリル (0.32mg)、第一ジェネレーションのリジンフィブリル (0.82mg)、第二ジェネレーションのリジンフィブリル及び第三ジェネレーションのリジンフィブリルを、重炭酸ナトリウム コンジュゲート緩衝液 (600 μ l, 0.1M, 0.9%のNaClを含有する) と共に室温で15分間超音波処理した。それから、それらを重炭酸ナトリウム コンジュゲート緩衝液の中のHRP溶液 (490ml, 5.6mg/mlの酵素ストック溶液) と共に、室温で19時間インキュベートした。HRPを固定化したフィブリルを次の緩衝液 (1ml) で洗浄した: 0.9%のNaClを含有する10mMのNaHCO₃緩衝液、pH9.5 (1X洗浄用緩衝液) で7回、1X洗浄用緩衝液の中の0.1%のトリトンX-100で5回、1X洗浄用緩衝液の中の50%のエチレングリコールで3回。HRPの活性度は過酸化水素溶液 (10 μ l, 10mMストック溶液) およびグリシジン アッセイ緩衝液 (50mM, pH4.4) の中の2, 2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン) -6-スルホン酸ニアンモニウム塩 (ABTS, 3 μ l, mMストック溶液) によって、414nmで検定した。結果は次の表に示した:

フィブリル	nmol HRP/g, フィブリル
ブレンフィブリル	3.82
Fib-NH ₂	8.58
Fib-NH-Lys	28.09
Fib-NH-Lys (Lys) ₂	28.30
Fib-NH-Lys (Lys) ₄	46.28

12. 二官能性フィブリル

一つタイプの官能基より多く (例えば、カルボキシル基とアミノ基) を同時にフィブリル上に導入することは、官能化されたナノチューブ、例えば、カルボキシナノチューブをアミノ酸と反応させることによって、できることがわかった。かかる二官能性ナノチューブは多数の分子を、特に、1:1の化学量論量で、そして接近させて、固定化するのに使用できる。

実施例40

リジンの付加による二官能性フィブリルの製造

N_a -CBZ-L-リジン ベンジル エステルの合成

反応順序は図7に示されている。 N_E -(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン (2 g, 8.12ミリモル) をメタノール (40ml) と水 (40ml) の中に溶解し、そしてトリエチルアミンによってpHを8に調節した。ジオキサンの中のN-(ベンゾイルオキシカルボニル-オキシ) スクシンイミドの溶液 (20mlの中の、2.4 g, 9.7ミリモル) を、上記混合物に加え、そしてトリエチルアミンによってpHを8~9に維持した。反応混合物を一晩攪拌した。溶媒を回転蒸発によって除去して粗 N_a -CBZ- N_E -(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジンを得た。 N_a -CBZ- N_E -(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジンを0.2Mの炭酸ナトリウム (4ml) で処理し、そして水性層を除去して白色固体を得た。固体をN,N-ジメチルホルムアミド (40ml) と臭化ベンゾイル (1.16ml) の中に再懸濁させた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチル及び水と混ぜ、そして有機相を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を除去して粗 N_a -CBZ- N_E -(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン ベンジル エステルを得、それを溶媒として酢酸エチル中の25%ヘキサンを使用するシリカゲル クロマトグラフィーによって精製した。塩化メチレン (10ml) の中の N_a -CBZ- N_E -(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン ベンジル エステル (1 g, 2.2ミリモル) に、トリフルオロ酢酸を0℃で加えた。反応混合物を0℃で10分攪拌し、それから室温で更に2.5時間攪拌した。溶媒を除去し、そして粗生成物を得た。シリカゲルクロマトグラフィーによって純 N_a -CBZ-L-リジン ベンジル エステルを得た。

N_a -CBZ-L-リジン ベンジル エステル フィブリルの合成

塩化メチレン (18ml) 中のカルボニルフィブリル (300mg) の懸濁物に、 N_a -CBZ-L-リジン ベンジル エステル (148mg, 0.32ミリモル、20mlの塩化メチレンと176 μ lのトリエチルアミンの中) を加えた。それから、HOBT (43.3 g, 0.32ミリモル) とEDC (63.3mg, 0.32ミリモル) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌して粗生成物を得た。生

物フィブリルをメタノール、塩化メチレン、及び水によって大規模に洗浄し、それから真空乾燥した。

官能性フィブリル Fib-Lys (COOH) NH₂の合成

メタノール (4ml) 中のN_α-CBZ-L-リジン ベンジル エステル フィブリル (113mg) に、水酸化ナトリウム (1N, 4ml) を加え、そして反応混合物を一晩攪拌した。生成物N_α-CBZ-L-リジンフィブリルを水およびメタノールで大規模に洗浄し、そしてフィブリルを真空乾燥した。アセトニトリニ (4ml) の中のN_α-CBZ-L-リジンフィブリル (50mg) の懸濁物に、トリメチルシリルヨージド (1ml) を加えた。混合物を40℃で3時間攪拌した。最終の二官能性フィブリルを水、メタノール、0.5Nの水酸化トリウム、アセトニトリル、及び塩化メチレンによって大規模に洗浄した。アミノ酸の分析はフィブリル1g 当り0.3マイクロモルのリジンを示した。

ヒドロキシルとカルボキシル (又はアミノ) の二官能性フィブリルは、セリン、トレオニン又はチオシンを使用することによって、ここに記載したのに似た方法によって製造できる。チオール化とカルボキシル (又はアミノ) の二官能性フィブリルはシステインを使用して製造できる。カルボキシルとアミノの二官能性フィブリルはアスパラギン酸又はグルタミン酸を使用して製造できる。

官能化されたナノチューブの用途

官能化されたグラファイト性ナノチューブはその高い気孔度、化学的及び物理的安定性、及び高い表面積によって多数のバイオテクノロジー分野における固体支持体として有用である。それらは過酷な化学的および熱的处理に適合性であり且つ化学的官能化を非常に受けやすいことが判明した。

例えば、酵素は修飾されたナノチューブ上に共有結合で固定化されることが、その生物学的活性を維持しながら可能である。その上、ナノチューブは生物分子の分離におけるアフィニティークロマトグラフィー用支持体としての用途にも適している。例えば、酵素阻害剤は多段階合成においてナノチューブ上に調製されたので、固定化された阻害剤は巨大分子に近づくことができたし、またタンパク

質と修飾フィブリルとの間に可逆の特異な生物学的認識が起こった。

ナノチューブ表面の疎水性は吸着によってタンパク質の高密度を固定化するに

は十分でない。ナノチューブ表面の疎水性を増加させるために及び疎水性環境を二次元から三次元に拡張するために、様々な長さのアルキル鎖をナノチューブ表面にカップリングさせた。アルキルナノチューブ上に吸着によって固定化されたタンパク質には、トリプシン、アルカリ性ホスファターゼ、リパーゼおよびアビジンが含まれる。これら固定化されたタンパク質の酵素活性度は遊離酵素のものに匹敵しており、それは水溶液中でのそれらの基質の加水分解に向かう触媒効率によって証明された。

加えて、アルキル鎖の末端にフェニル基の付加を有するアルキルナノチューブであるフェニル-アルキルナノチューブも製造された。この修飾は、 $\pi-\pi$ 相互作用を通してタンパク質の中のアミノ酸フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンと相互作用する芳香族構造を導入した。フェニル-アルキルナノチューブ上へのアルカリ性ホスファターゼ及びリパーゼの吸着は C_8 -アルキルナノチューブ上への吸着に匹敵した。

官能化されたフィブリルはタンパク質合成のための固体支持体として有効であることも判明した。

1. 酵素のための固体支持体としての官能化されたナノチューブ

実施例 4 1

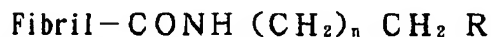
吸着による酵素の固定化

アルキルフィブリルの製造

10mgのカルボキシルフィブリル（それは $-COOH$ 基を約0.007ミリモル含有する（10mgのフィブリル \times 0.7ミリモルの $-COOH/mg$ フィブリル $=$ 0.007ミリモル））を、

0.14ミリモルのEDA（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）及び0.14ミリモルのDMAP（4-ジメチルアミノピリジン）を使用して、1.5mlのDMF（N,N-ジメチルホルムアミド）の中の0.14ミリモルのアルキルアミンと、

反応させることによって、アルキルフィブリルを製造した。化学反応は次の通りである：



この手順によって、異なる長さのアルキル鎖 ($n=5, 7, 9, 17$; $n=5$ の場合、 R は OH のみ) を有する幾つかの異なるアルキルフィブリルを製造した。反応系を室温で一晩攪拌した後、フィブリルを $3 \times 2.5 \text{ ml}$ の CH_2Cl_2 、 $3 \times 2.5 \text{ ml}$ の MeOH 、及び $3 \times 2.5 \text{ ml}$ の dH_2O によって激しく洗浄した。フィブリル中の窒素含量についての元素分析は反応の収率が $65 \sim 100\%$ であったことを示した。

酵素の吸着

酵素リパーゼ、トリプシン、アルカリ性ホスファターゼ及びアビジンはこの実施例のアルキルフィブリルの上に吸着によって固定化された。アルキルフタロシアンと酵素を室温で $3 \sim 4$ 時間混合した後、 5 mM の磷酸ナトリウム ($\text{pH } 7.1$) で $2 \sim 4$ 回洗浄した。アルカリ性ホスファターゼは C_8 -フィブリルおよび C_8OH -フィブリルの上に固定化された；トリプシンは C_6 -、 C_8 -、 C_{10} -及び C_{18} -フィブリルの上に；リパーゼは C_8OH -、 C_8 -、 C_{10} -、及び C_{18} -フィブリルの上に；そしてアビジンは C_8 -フィブリルの上に固定化された。結果は次の表に示されている：

酵 素	$\mu\text{mol/g}$ フィブリル	mg/g フィブリル
リパーゼ	6.8	816
トリプシン	1.7	40
アルカリ性ホスファターゼ	0.66	56
アビジン	not determined	

固定化酵素の反応速度特性は次の表に示されているように遊離酵素のそれに匹敵することが判明した：

酵 素	K_m (M)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat} / K_m ($M^{-1}s$)
リパーゼ	4.0×10^{-6}	0.040	0.99×10^3
リパーゼー フィブリル	3.6×10^{-6}	0.048	1.34×10^3
トリプシン	1.2×10^{-3}	4.8	4.17×10^3
トリプシンー フィブリル	7.9×10^{-3}	19.1	2.43×10^3

基質：リパーゼ 1, 2- α -ジラウリル-rac-グリセロール-3-グルタル酸
レゾルフィンエステル

トリプシン N- α -エイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリド

実施例 4 2

フィブリル-リパーゼによって触媒されたエステル化

(酪酸エチルの合成)

リパーゼを実施例 4 1 の手順に従って C_8 -アルキルフィブリルの上に固定化した。リパーゼフィブリルをまずジオキサンで洗浄し、それからジオキサンとヘプタンの混合物で洗浄し、そしてフィブリルをヘプタンの中に分散させるために最後にヘプタンで洗浄した。酪酸エチル (パイナップル-バナナの香りを与える食品添加物) を合成するために、 $6.2 \mu m$ のフィブリル固定化リパーゼを含有するヘプタンの中でエタノール (0.4 M) と酪酸 (0.25 M) を混合した。反応混合物を室温で攪拌した。収率は 7 時間で 60% であった。それは確立された方法を使用して反応混合物の中のエタノール濃度を測定することによって測定した。反応および結果は図 8 に示されている。

実施例 4 3

フェニル-アルキル フィブリルの上への

アルカリ性ホスファターゼの固定化

フェニル-アルキル フィブリルの製造

2 つの異なる反応系によってフェニル-アルキル フィブリルを製造した。反

応1は、20mgのカルボキシルフィブリル（約0.014ミリモルの-COOH基を含有する）を1.5mlのDMF（N,N-ジメチルホルムアミド）の中の0.28ミリモルの4-フェニルブチルアミン、0.28ミリモルのEDC及び0.28ミリモルのDMAP（4-ジメチルアミノピリジン）と混合した。反応2は、20mgのカルボキシルフィブリルを1.5mlのDMFの中の0.28ミリモルの6-フェニル-1-ヘキサノール、0.28ミリモルのDOC（1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド）及び0.28ミリモルのDMAPと混合した。反応は室温で一晩攪拌しながら行った。それから、フィブリルを3×25mlのCH₂Cl₂、3×25mlのMeOH、及び3×25mlのdH₂Oによって激しく洗浄した。

アルカリ性ホスファターゼを固定化したフィブリルの製造

0.5mgのフェニル-アルカリ フィブリルを400μlの0.05Mのトリス（pH8.6）の中に懸濁させ、そして20分間超音波処理した。これらフィブリルに150μlのアルカリ性ホスファターゼの溶液（5mMの磷酸ナトリウム緩衝液中で1.67mg/ml、pH7.0）を加え、そして混合物を室温で2時間回転させ、そして4℃で一晩貯蔵した。それから、フィブリルを600μlの5mMの磷酸ナトリウム緩衝液（pH7.1）で2回洗浄し、そして200μlの同じ緩衝液の中に懸濁させた。

触媒活性の測定による特異固定化アルカリ性ホスファターゼの定量

アルカリ性ホスファターゼは基質p-ニトロフェニルホスフェートと反応し、そして405nmの光を18,200M⁻¹cm⁻¹の吸光係数をもって吸収する着色化合物を放出する。この反応のためのアッセイ バッファー条件は10mMのトリス、1mMのMgCl₂、及び0.1MのZnCl₂、pH=8.4であった。反応は1mlの浅鉢の中で5μlのp-ニトロフェニルホスフェートのストック溶液（アッセイバッファー中の33%のDMSOの中の0.5M）と1mlのアッセイバッファー中の13μgのアルカリ性ホスファターゼ フィブリルとを混合することによって行った。405nmの吸光度の増加は 分間のタイムスキャンによってモニターした。それから、吸光係数18200M⁻¹cm⁻¹を使用して初期勾配から酵素活性度（μM/分）を算出した。

反応1からのフェニルフィブリルの上に吸着されたアルカリ性ホスファターゼについては、活性度は13 μ gのフィブリル当り6.95 μ M/分であった。反応2からのフェニルフィブリルの上に吸着されたアルカリ性ホスファターゼについては、活性度は13 μ gのフィブリル当り2.58 μ M/分であった。これら結果は同じアッセイ条件下で1 μ Mのアルカリ性ホスファターゼ当り879.8 μ M/分であると測定された既知濃度のアルカリ性ホスファターゼの活性度を除することによって、フィブリル1 g当り、それぞれ、0.63マイクロモル（又は54 mg）及び0.23マイクロモル（又は20 mg）の活性なアルカリ性ホスファターゼに換算された。

実施例 4 4

フェニルアルキルフィブリル上へのリパーゼの固定化

リパーゼを固定化したフィブリルの製造

0.5 mgのフェニルアルキル フィブリルを50 μ lの5 mMの磷酸ナトリウム緩衝液（pH 7.1）の中に懸濁させ、そして20分間超音波処理した。これらフィブリルに350 μ lのリパーゼ溶液（5 mMの磷酸ナトリウム緩衝液中の2.5 mM, pH 7.1）を加え、そして混合物を室温で5時間回転させ、そして4℃で一晩貯蔵した。それから、フィブリルを600 μ lの5 mMの磷酸ナトリウム緩衝液（pH 7.1）で3回洗浄し、そして200 μ lの同じ緩衝液の中に懸濁させた。

触媒活性の測定による特異固定化リパーゼの定量

リパーゼは基質1, 2-*o*-ジラウリル-*r a c*-グリセロール-3-グルタル酸-*レゾルフィン* エステル (Boehringer Mannheim, 1179943) と反応し、そして572 nmの光を60,000 $M^{-1}cm^{-1}$ の吸光係数で吸収する着色化合物を放出する。この反応のためのアッセイ バッファー条件は0.1 MのKH₂PO₄, pH=6.8であった。反応は1 mlの浅鉢の中で5 μ lの基質ストック溶液 (Thesitの中の50%ジオキサンの中の7.6 mM) と1 mlのアッセイバッファー中の13 μ gのアルカリ性ホスファターゼ フィブリルとを混合することによって行った。572 nmの吸光度の増加は10分間にわたるタイムスキャンによってモニターした。それから、吸光係数60,000 $M^{-1}cm^{-1}$ を使用して

初期勾配から酵素活性度 ($\mu\text{M}/\text{分}$) を算出した。

実施例 4 3 の反応 I からのフェニルフィブリルの上に吸着されたリパーゼについては、活性度は $13\mu\text{g}$ のフィブリル当り $0.078\mu\text{M}/\text{分}$ であった。実施例 4 3 の反応 2 からのフェニルフィブリルの上に吸着されたリパーゼについては、活性度は $13\mu\text{g}$ のフィブリル当り $0.054\mu\text{M}/\text{分}$ であった。これら結果は同じアッセイ条件下で $1\mu\text{M}$ のアルカリ性ホスファターゼ当り $1.3\mu\text{M}/\text{分}$ であると測定された既知濃度のリパーゼの活性度を除することによって、フィブリル 1g 当り、それぞれ、 4.7 マイクロモル (又は 564mg) 及び 3.3 マイクロモル (又は 396mg) の活性なリパーゼに換算された。

実施例 4 5

アミノアルキル修飾フィブリルの上への

ホースラディッシュ ペルオキシダーゼ (HRP) の固定化

カルボン酸で官能化されたフィブリル (カルボキシルフィブリル) の製造

10.0g のグラフェイト性フィブリルを 450mL の濃硫酸の中にスパチュラで混合することによってスラリー化し、それから流入口/流出口と頭上攪拌機を備えた反応フラスコに移した。攪拌しながら、ゆっくりのアルゴン流の下で、室温で 24 時間かけて装填量 8.68g の NaClO_3 を少しずつ加えた。実験の全過程に発生する塩素蒸気は反応器からスウィープされて NaOH 水溶液トラップの中へ追い込まれた。実験の最後に、フィブリルスラリーを砕いた氷の上に注ぎ、そして真空濾過した。それから、フィルターケーキをソックスレー円筒濾紙に移し、そしてソックスレー抽出器の中で脱イオン水で数時間毎に新しい水に交換しながら洗浄した。洗浄はフィブリルの試料が新しい脱イオン水に加えられたときに水の pH を変化させなくなるまで継続した。それから、カルペキシル化フィブリルを濾過によって回収し、そして $5''$ 真空で 100°C で一晩乾燥した。収量は 10.0g であった。

HRP を固定化したフィブリルの製造

実施例 2 7 の方法を使用して $1,6$ -ジアミノヘキサンから製造したアミノフィブリル (1.2mg) をコンジュゲートバッファー (0.1M NaHCO_3 、 $0.9\% \text{NaCl}$ 、 $\text{pH} 9.5$) に加え、そしてこの懸濁物を 20 分間超音

波処理した。それから、フィブリルをエッペンドルフ管の中でコンジュゲートバッファーによって2回洗浄し、そして400 μ Lのコンジュゲートバッファーの中に懸濁させた。懸濁物の50 μ Lアリコート(0.14mgのフィブリル)を、50 μ Lの脱イオン水の中に溶解した4.0mgの活性化HRP(ピラス、IL州ロックフォード在)と混合し、そして得られた懸濁物を4℃で一晩回転させた。HRPをコンジュゲートされたフィブリルをエッペンドルフ遠心管の中で次の溶液の組み合わせにより大規模に洗浄した:コンジュゲートバッファー、洗浄緩衝液(20mMの KH_2PO_4 、0.45% NaCl、pH6.2)、0.03~0.1%のトリトンX-100を含有する洗浄緩衝液、及び50%のエチレングリコールを含有する洗浄緩衝液。対照として、活性化HRPを含む同一のマニプレーションをブレン(非誘導体化)フィブリルをもって実施したところ、アミノフィブリルへのHRPの結合が実際に特異共有結合であったことを示した。

触媒活性の測定による特異固定化HRPの定量

大規模な洗浄は非特異結合した酵素の大部分を除去した。固定化活性HRPは過酸化水素と色素原基質2,2'-アジノービス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)二アンモニウム塩(ABTS)を使用しての基質のターンオーバーによって定量化された。HRPの触媒活性度は100 μ Mの過酸化水素と30 μ MのABTSを基質として使用して414nmにおいて分光測定でモニターした。これらの予備研究においてアミノフィブリルに結合した酵素の全量はフィブリル1g当り0.0230 μ molのHRPであった。これに比べて対照(ブレンフィブリル)はフィブリル1g当り0.0048 μ molのHRPが非特異に結合した。引き算すると、共有結合で(特異結合した)HRPの量はフィブリル1g当り0.0182 μ molであった。

実施例46

固定化された酵素阻害剤を担持するフィブリル上での

アルカリ性ホスファターゼ(AP)と β -ガラクトシダーゼ(β G)の

アフニティークロマトグラフィーによる分離

アルカリ性ホスファターゼ阻害剤フィブリルの製造

AP-阻害剤で修飾されたフィブリルの製造はブレナ(Brenne)らの方法に基

づいた(Brenna et al., (1975), Biochem. J., 151:291-296)。

カルボキシル化フィブリルを使用して、上記の実施例50に記載したように、NHSエステルフィブリルを製造した。4mLのアセトンにNHSエステルフィブリル(114mg)を懸濁させ、そして(フィブリル1g当り0.7meqのNHSエステルとの推定に基づいて)10当量のチラミン(tyramine)を添加した。乾燥トリエチルアミン(10当量)を添加し、そして混合物を室温で3時間攪拌した。チラニルフィブリルを焼結ガラスの濾過漏斗の中で真空中で最初にアセトンによって、それから大規模に脱イオン水によって洗浄した。

4-(p-アミノフェニルアゾ)-フェニルアルソン酸(66mg)を4mLの1NのHClの中に懸濁させた。懸濁物を4℃に冷却しそして0.36mLの0.5MのNaNO₂とゆっくり混合した。15分後、アルソン酸/NaNO₂混合物を、10mLの0.1MのNaCO₃(pH10.0)の中に懸濁されたチラニルフィブリルに加えた。反応混合物(pH~10)を4℃で一晩攪拌した。それから、フィブリルを0.1MのNa₂CO₃(pH10.0)、8Mのグアニジン塩酸塩、25mMのNaOH、そして流出液が透明になるまで水による、連続洗浄によって処理した。AP阻害剤フィブリルの中のヒ素についての元素吸光分析をガルブレイス研究所(TN州ノックビル)によって行った。砒素1原子を含有している側鎖を含むAP阻害剤フィブリルは原子吸光分析によって何らかの砒素の含量が0.4%であることが判明した。これは推定される初期COOH基のほぼ10%がこの多段階合成においてAP阻害剤に転化されたことを表している。フィブリルの表面積を基準にすると、これは表面積500平方オングストローム毎に1つの阻害剤分子(酵素結合サイト)が存在するであろうことを意味している。

β-ガラクトシダーゼ阻害剤フィブリルの製造

p-アミノフェニル-β-D-チオガラクトシダーゼ(TPEG)誘導フィブリルを、ウルマンの方法(Ullman, (1984) Gene, 29:27-31)に基づいて製造した。2.24mgのTPEGを、0.2mLの脱イオン水の中の8mgのカルボキシル化フィブリルに加えた。懸濁液のpHを0.1MのHClで4.

0に調節し、そして15mgのEDACを加えた。混合物をpH4.0で、室温で

3時間攪拌した。エッペンドルフ管の中での急速遠心分離によって反応を停止し、そして液体を除去した。 β -ガラクトシダーゼ阻害剤フィブリルを脱イオン水中への再懸濁と遠心分離によって5回洗浄した。

アフィニティークロマトグラフィー

アルカリ性ホスファターゼ (AP) (大腸菌 (E. Coli, Type III) から、シグマ ケミカル社 (Sigma Chemical Co.)、MO州セントルイス) と、 β -ガラクトシダーゼ (β G) (大腸菌 (E. Coli) から、カルビオケム (Calbiochem)、CA州ラジョラ) の混合物は、エッペンドルフ ミクロ遠心管の中で、AP阻害剤フィブリル又は β G阻害剤フィブリルのどちらかの上で、バッチ関連で分離された。アフィニティー分離のために、AP (一般に約10ユニット) と β G (一般に約280ユニット) の両方を含有するローディング バッファー (20 mM トリス、10 mMのMgCl₂、1.6 MのNaCl、10 mMのシステイン、pH 7.4) の溶液1.0 mLを、0.8~11.0 mgのAP又は β Gどちらかの阻害剤フィブリルに加えた。得られた懸濁物を穏やかにかきまぜ、それから室温で2時間回転させた。酵素結合の後に、フィブリルを卓上遠心分離器で簡単な遠心分離によって沈殿させ、そして未結合酵素を含有する液相を引き出し、そして酵素検定のためにとっておく。ローディング バッファーによる洗浄 (7×1.0 mL) は、バッファー添加、穏やかなかきまぜ、15分の保留、簡単な遠心分離、及びパスツール ピペットによる溶媒撤収の繰り返しによって行った。7回洗浄後に、同じマニプレーションを、 β G阻害剤フィブリル (100 mMのホウ酸ナトリウム、10 mMのシステイン、10 mMのシステイン、pH 10.0) またはAP阻害剤フィブリル (40 mMのNaH₂PO₄、10 mMのトリス、1.0 mMのMgCl₂、0.1 mMのZnCl₂、pH 8.4) どちらかについての適切な溶出緩衝液をもって繰り返し実施した (5×1.0 mL)。

全ての分画 (未結合酵素、洗浄液、及び溶出液) をAPと β G両方の活性度について検定した。アルカリ性ホスファターゼ活性度は500 μ Mのp-ニトロフェニルホスフェート (PNPP) の加水分解速度を410 nm ($\Delta \epsilon = 18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) において分光測定で監視することにより測定した。アルカリ性ホ

スファターゼ活性度測定は10 mMトリス、1.0 mMの MgCl_2 、および0.1 mMの ZnCl_2 、pH 8.4、の中で行った。 β -ガラクトシダーゼは2-ニトロ-ガラクト- β -D-ピラノシド (ONPG) を加水分解する酵素の能力を分光測定で監視することにより検定した。5.0 mMのONPGの、 β -ガラクトシダーゼで触媒された加水分解の初期速度を、10 mMトリス、10 mMの MgCl_2 、1.6 MのNaCl、10 mMのシステイン、pH 7.4の中で、405 nm ($\Delta\epsilon = 3500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) で測定した。

AP阻害剤フィブリルおよび β G阻害剤フィブリルどちらでも、APと β Gの混合物を加えた。特異結合容量の測定を容易にするために、添加酵素の濃度は固体化阻害剤濃度の大きな過剰の中にあった。AP阻害剤フィブリルでは、フィブリルのg当り0.550 μmol のAPが結合した（これに対して β Gの非特異結合はフィブリルのg当り0.020 μmol ）。 β G阻害剤フィブリルでは、容量はフィブリルのg当り0.093 μmol の β Gであると測定された（これに対してAPの非特異結合はフィブリルのg当り0.012 μmol ）。アフィニティークロマトグラフィー実験の結果は図9と図10に示されている。AP阻害剤フィブリルは評価できるほどには β Gを結合しなかった、しかしAPを結合した、これはバッファーに40 mMのホスフェート、競合阻害剤、が添加されたときには特に溶出された（図9）。 β Gによって誘導されたフィブリルは実質的量のAPを結合しなかった、しかし β Gを結合した、これは酵素阻害剤の提携を弱めるためにpHを高くしたときには特に溶出された（図10）。これら結果は阻害剤がフィブリルにうまく共有結合されたこと、固定化阻害剤が大きな分子に近づき得たこと、阻害剤が特異酵素結合のために利用可能であったこと、及び特に溶離されたときに酵素が活性のままであったことを示している。図10では、 β G阻害剤フィブリルからの β Gの連続浸出があるようである。AP阻害剤フィブリルによる図9では同じ現象がみられないので、これはフィブリルの欠点というよりむしろ自然の弱い酵素-阻害剤親和力の結果であるらしい。

2. 抗体の固体支持体としての官能化ナノチューブ

官能化されたナノチューブの上に抗体を固定化することができること、及びかかる抗体ナノチューブはそれらの重量当りの高い表面積、電気伝導性、及び化学

的及び物理的安定性によって多数の応用のための独特の利点を有することが判明した。例えば、抗体ナノチューブは分子分離のためのアフィニティー試薬として使用できる。抗体ナノチューブはまた、ECL系免疫検定のような診療用免疫検定を含めて分析の応用のためにも有効である。

抗体は共有結合又は非共有結合どちらかによって固定化されることができる。共有結合固定化は様々な方法によって行われた；抗体のカルボキシレート基の反応性アミノ化、カルボキシル化フィブリンのNHSエステル活性化（上記実施例27を参照）、及びチオール化フィブリン又はマレイミドフィブリンと還元された又はマレイミド修飾された抗体との反応（上記の実施例23及び25参照）が挙げられる。

抗体をナノチューブに付着させるための最善の方法はそれらが使用されるべき用途に依存する。分離用には、好ましい方法は非共有結合の吸着であるかも知れない、何故ならば、タンパク質結合の容量がこの方法のためには最も高いと思われるからである。フィブリンの電気伝導度が重要であるかも知れない、ECLを包含する方法のためには、共有結合方法が好ましいであろう（アルキル付加物は弱い電氣的導体でありフィブリンを絶縁することが期待できる）。還元性アミノ化はフィブリンに抗体を共有結合するための最善の方法であるらしい、何故ならば、この方法を使用することによって、抗体はそれらの結合サイトが（フィブリンから遠い）外側を向くように正しく配向されるからである。

3. 官能化されたナノチューブへのNAD⁺の付加

NAD⁺のような補助因子は酵素補助因子に結合するタンパク質の生体特異アフィニティークロマトグラフィー用の固体支持体に付加されそして固体支持体として使用することができる。例えば、NAD⁺フィブリンはデヒドロゲナーゼの純化のための固体支持体として使用されている。フィブリンを使用する主な利点はそれらの大きな量の接近可能な表面積である。高い表面積を有するアフィニティークロマトリックスは高い潜在容量故に望ましい。フィブリンはゆるい分散物であるか又はカラム若しくはマット状に固定されるかどちらでもよい。

実施例47

NAD⁺フィブリン上のデヒドロゲナーゼの

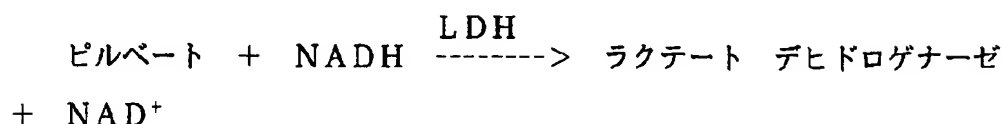
NAD⁺フィブリルの製造

フィブリルを実施例14及び15に従ってヒドロキシル基を導入するために酸化した。重炭酸ナトリウム溶液(3ml、0.2M、pH8.6)の中のフィブリル(31mg)の懸濁物に、N⁶-[アミノヘキシル]カルバモイルメチルニコチンアミド アデニン ジヌクレオチド リチウム塩溶液(25mg)シグマから入手、5mlの重炭酸ナトリウム溶液の中を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。生成物フィブリルを水、N,N-ジメチルホルムアミド、及びメタノールによって大規模に洗浄した。元素分析データは生成物フィブリルが窒素分析によってフィブリルのg当り130ミリモルのNAD分子を、そして燐分析によってフィブリルのg当り147ミリモルのNAD分子を含有したことを示した。アミノ基の中に末端停止するリンカーを有するその他のNAD⁺類似体はNAD⁺フィブリルを製造するのに使用できる。

アフィニティー分離

NAD⁺固定フィブリル(0.26mg)及びブレンフィブリル(0.37mg)を燐酸ナトリウム(1ml、0.1M、pH7.1)の中の0.1%のポリエチレングリコール(PEG, MW1000)と一緒に40℃で30分間超音波処理し、それから40℃で30分間インキュベートした。フィブリル懸濁物を遠心分離し、そして上澄みを除去した。フィブリルを、L-ラクテート デヒドロゲナーゼ(LDH)の、0.1%のPEG(1000)燐酸ナトリウム緩衝液(250μl、LDH溶液と0.1%のPEG緩衝液の比は1:1)の中の混合物と一緒に4℃で90分間インキュベートした。それから、混合物を室温で30分間平衡化した。フィブリルのLDHとのインキュベーションの後で、フィブリルを燐酸ナトリウム緩衝液中の0.1%のPEG(1000)によって洗浄し(5×1000μl)、そして洗浄毎に15分間の回転を採用した。LDHは0.1%のPEG(1000)燐酸ナトリウム緩衝液(5mM、3×1000μl)の中の5mMのNaDHによって溶出された。各溶出洗浄中に、フィブリルを15分間回転させた。溶出液中のLDH活性度はビルビン酸塩の還元中の340nmにおける吸光度変化を測定することによって検定した。検定混合物は燐酸ナトリウム緩衝液

(980 μ l)中の0.1%のPEG (1000)、ピルビン酸塩 (3.3 μ 、100mMストック溶液)、及び各溶出画分 (16.7 μ l)を含有していた。酵素反応は下記のように示される：



結果はNAD⁺固定化フィブリル上のLDHの容量がフィブリル当り484ナノモルであり、そしてプレーンフィブリル (対照) 上のLDHの容量がフィブリル当り3.68ナノモルであることを示した。LDHの非特異結合は5.6%であった。

4. タンパク質合成用の固体支持体としての

官能化されたナノチューブ

実施例 48

タンパク質合成のための固体支持体としての

官能化されたナノチューブ

アミノフィブリル (400mg) と塩化メチレン (20ml) 中の4-(ヒドロキシメチル)-フェノキシ酢酸懸濁物 (255mg、1.4ミリモル) との混合物に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC、268mg、1.40ミリモル) と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt、189mg、1.4ミリモル) を加えた。反応混合物をアルゴンガス下で室温で一晩攪拌した。生成物フィブリルを塩化メチレン、メタノール及び水によって大々的に洗浄し、それから真空下で乾燥してフィブリルを得た。N, N-ジメチルホルムアミド (DMF、2ml) と塩化メチレン (8ml) 中のフィブリルの懸濁物に、N-(9-フニオレニルメトキシカルボニル)-O-ブチル-L-セリン (215mg、0.56ミリモル)、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC、115mg、0.56ミリモル) 及び4-ジメチルアミノピリジン (DMAP、3.4mg、0.028ミリモル) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌し、そして生成物フィブリルをDMF中の20%ピペリジン (5×40ml、毎回1分浸漬) で洗浄した。それから、生成物フィブリルをDMF、水、水酸

化ナトリウム（1N）、メタノールおよび塩化メチレンで大々的に洗浄した。生成

物 フィブリンーハンドルーセリン(O+)-COOH（ニンヒドリン試験は+）を真空乾燥した。ジペプチド合成のために、同じ手順を使用してアルギニンを付加した。フィブリンーハンドルーセリン(O+)-アルギニン（N^E-2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホン）の amino 酸分析データは、それがフィブリンの g 当り 6.5 μ モルのセリンとフィブリンの g 当り 7.6 μ モルのアルギニンを含有することを示している。他のどのペプチドも同じ方法によって製造できる。

5. ビオチン化されたフィブリン及び ビオチン化されたアルキルフィブリン

フィブリン表面をビオチン化(biotinylation)によって又はアルキル化とビオチン化によって官能化することができる。かかる修飾を含有するフィブリンはそれから、ストレプトアビジンビーズやストレプトアビジン酵素のようなあらゆるストレプトアビジン コンジュゲート基質を結合できる。

フィブリンはその大きな表面積故に固体担体として大きな利点を呈する。強磁性につくこともできるビーズは分離検定に極めて有効である。ここで説明するビオチン化フィブリンはフィブリンとビーズの両方の利点を組み合わせる。ビオチン化アルキルフィブリンは同じコンセプトの拡大であるが、アルキルフィブリンの追加のタンパク質吸収特性を示す。

ストレプトアビジン-及びビオチン-で被覆されたフィブリンは診療に使用でき、そして電気化学的発光アッセイのようなアッセイ用にキャプチャー剤として使用することができる。

この発明の新規特徴は1つのフィブリンに2つの固体担体を組み合わせて二官能性フィブリンを創造することにある。さらに、開示された方法はビーズのための表面積を増大させ、及びフィブリンの磁化を強くする。

実施例 4 9

ビオチン化フィブリンの製造

ビオチン化フィブリルは、実施例16に記載した如く製造したアミノフィブリル2.4mgと、8.15のpHの、0.2MのNaHCO₃緩衝液中の9mgのNHSエステル長鎖ビオチンを混合することによって製造した。混合物は室温で4

時間回転させ、そして同じ緩衝液で2回洗浄した。

実施例50

ビオチン化アルキルフィブリルの製造

ビオチン化アルキルフィブリルは2段階反応によって製造した。第一段階で、4.25mgの二官能性フィブリル（アミノとカルボキシルの両方を含有する）と25mgのNHSエステル長鎖ビオチンを混合した。フィブリルを洗浄し、そして真空乾燥した。

第二の反応は、4mgのビオチン化された二官能性フィブリルを、11mgのEDC（1-エチル-3，3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）、7.5mgのDMAP（4-ジメチルアミノピリジン）及び0.5mlのDMF中の10μlのNH₂(CH₂)₇CH₃と混合することによって行った。混合物を室温で一晩攪拌した。最終のビオチン化されたアルキルフィブリルは塩化メチレン、メタノール、及び脱イオン水によって洗浄した。

実施例51

アッセイの固体支持体としてのビオチン化フィブリル

ビオチン化フィブリルはストレプトアビジン-ビオチンまたはアビジン-ビオチンの相互作用を必要とするフォーマットを包含するアッセイに使用できる。ビオチン化フィブリルは、たとえば、ストレプトアビジンによって更に誘導体化されることができた。フィブリルに共有結合したビオチン（実施例50参照）はストレプトアビジンと強い非共有結合の相互作用を形成することができた。ストレプトアビジンは4当量結合サイトを有するテトラマー性タンパク質であるので、ビオチン化フィブリルに結合したストレプトアビジンは別のビオチン化された試薬が結合できる未占有の結合サイトをほぼ確実に有していたであろう。従って、ビオチン化フィブリルはストレプトアビジン被覆フィブリルに転化されたであろう。

かかるフィブリル-ビオチン-ストレプトアビジン (FBS) 支持体を使用して行うことができる多数の分析試験が存在する。たとえば、ビオチン化された抗アナライト抗体は (抗体がアナライト (analyte) に対して複合化される前又はされた後どちらかに) FBS 支持体上に捕獲されることができた。ビオチン化され

た抗アナライト抗体は十分に確立されている。かかる検定としては、関心あるアナライトが抗アナライト抗体への結合に関して標識アナライトと競合する競合検定が包含される。フィブリルで固体化された抗体から、遊離 (未結合) アナライトと遊離 (未結合) 標識アナライトを洗浄できる。洗浄工程は遠心分離や濾過や磁石への吸引によるを包含する通常実施の手法によって溶液相から物理的に分離されるフィブリルに依存する。

競合検定の外に、サンドイッチ型免疫検定がFBS支持体上で実施できた。サンドイッチ免疫検定は診療の分野で十分に知られている。かかる検定は同時に2つの抗体によって結合されるアナライトを包含し; その第一の「主」抗体は例えばビオチンで標識されることによって固体表面に捕獲され、そしてその「第二」抗体は固体表面によって捕獲されないがレセプター基によって標識される。かかるサンドイッチ検定はフィブリルを固体キャプチャー支持体として使用しそれによってフィブリルが前段に記載のように捕獲される、で実施することができた。従って、かかる検定においては、フィブリルは既に共有結合でビオチンに結合しており、ビオチンはストレプトアビジンに結合され、ストレプトアビジンは転じて、ビオチン化された主抗体に結合され、ビオチン化された主抗体はアナライト (存在するならば) に結合され、アナライトは標識された第二抗体に結合されたのあろう。

同様に、DNAプローブアッセイはFBS支持体を使用して実施することができた。ビオチン化された一本鎖DNAはFBS支持体に結合されることができ、そして競合ハイブリッド化が相補性一本鎖アナライトDNA分子と相補性標識オリゴヌクレオチドの間に起こることができる。

別のタイプのビオチン化フィブリル、ビオチン化アルキル化フィブリル、は免疫検定及びDNAプローブ検定に使用できる。実施例51に記載されているよう

に、二官能性フィブリルは一方のタイプの官能基にビオチンが共有結合しそしてもう一方のタイプの官能基にアルキル鎖が共有結合することによって修飾されることができる。得られたアルキル化されておりビオチン化されているフィブリルは、(ビオチンによって) ストレプトアビジン又はアビジンとの特異会合に及び(アルキル鎖によって) タンパク質の吸着用に、両方に使用できる。

アルキルフィブリルは他の固体支持体、例えば、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズ、と組み合わせても使用できた。かかるビーズの上のフィブリルの一つの利点は(単位重量当りの) はるかに高い表面積を有することである。従って、フィブリルが磁性ビーズの外表面に付着できるならば、これはビーズの表面積従って結合容量を劇的に改良するであろう。アルキル化ビオチン化フィブリルはストレプトアビジン被覆ビーズと混合することができ、その結果、高い親和力のストレプトアビジン(ビーズ) - ビオチン(フィブリル) の相互作用を、従って極めて高い表面積をもつフィブリル被覆ビーズを生じることが考えられる。アルキルフィブリルはタンパク質を吸着によって結合できるので、フィブリル被覆ビーズはストレプトアビジンや抗体を包含する吸着されたタンパク質によって更に誘導体化されることができた。上記の通り、ストレプトアビジンまたは抗体で被覆されたフィブリルは免疫検定およびDNAプローブ検定に使用できる。従って、フィブリル被覆ビーズは与えられたアッセイにおいて同じ結果を与えるのにより少ないビーズしか必要とされないようにその表面積を劇的に増大させることによってビーズの性質を改良することができた。

6. 三次元構造

酸化フィブリルは非酸化フィブリルよりも容易に水性媒体中に分散される。中位乃至大きい気孔(> 2 nmの気孔)を有する安定な多孔性の三次元構造体は触媒又はクロマトグラフィー用支持体として非常に有効である。フィブリルは個性化された規準で分散できるので、架橋結合によって安定化されているよく分散された試料はかかる支持体を構成することを可能にする。官能化されたフィブリルはこの応用のために理想的である、何故ならば、それらは水性または極性媒体の中に容易に分散され、かつ官能基が架橋結合点を提供するからである。加えて

、官能基は触媒サイトまたはクロマトグラフィーサイトを支持する点を提供する。最後の結果はその全表面積が活性剤を支持するための官能性サイトをもって入手できる硬質の三次元構造である。

触媒におけるこれら支持体にとっての代表的な応用は、含浸によってつくられる金属触媒、例えば、貴金属水素化触媒、のための高度に多孔性の支持体としての使用を包含する。さらに、構造体の非常に高い気孔度と組み合わせられた官能基

を介しての支持体へのつなぎとめによって分子状触媒を固定する能力は、不均質な仕方で均質反応を行うことを可能にする。つなぎとめられた分子状触媒は均質反応器に似た連続液相の中では本質的に懸垂状態にあり、そこでは均質反応に沿って選択性及び速度に有利な使用を可能にする。しかしながら、固体支持体につなぎとめられていると、活性剤、多くの場合は、非常に高価な触媒、の容易な分離および回収を可能にする。

これらの安定で硬質な構造は以後、不斉合成又はアフィニティークロマトグラフィーのような非常に難しい反応を行うことも、適するエナンチオマー触媒または選択性基質を支持体に付着させることによって、可能にする。メタローPc又はメタローポルフィリン錯体を通しての誘導体化はまた、金属イオンに結合した配位子の回収、及び更には、二次誘導体を通して配位に結合する何らかの分子を見込んでいる。例えば、官能化されたフィブリルの三次元構造が電極又は電極の部分であり、そして官能化がCo(II)Pcの吸着から生じた場合には、ニコチン酸の存在下でのCo(II)からCo(III)への電気化学的酸化は垂下基としてカルボン酸を有する非不安定性のCo(III)-ピリジル錯体を生成するであろう。適する抗原、抗体、触媒性抗体、またはその他のサイト特異性トラッピング剤の結合はそうでなければ極めて達成し難い分子の選択分離（アフィニティークロマトグラフィー）を可能にする。吸蔵物質を除去するために電極を洗浄した後、目標分子を含有するCo(III)錯体を電気化学的に還元して不安定性Co(II)錯体を回収することができる。それから、目標分子を含有するCo(II)上の配位子は不安定性Co(II)配位子の質量作用置換によって回収でき、それによって、そうでなければ遂行が非常に困難であるか又は高くつく分子（例えば、キラル薬剤）

の分離又は回収が行われる。

以前は、官能化されたカーボンフィブリルマットの内部の気孔は小さすぎて有意な流れを許さず従って電極を通る流れとして有効でないと考えられた。また、電極材料としての粒子状炭素又はその他の炭素系材料（例えば、網状化無定形炭素（Reticulated Vitreous Carbon）（RVC））の使用に関連した問題も存在した。たとえば、多孔性電極材料はその場で生成できず、非常に密に充填されそしでいて空隙や溝を形成し、溶媒やフロー条件の変化の間に寸法不安定性にさらさ

れ、そして非常に薄い電極の形成が不可能であった。官能化されたカーボンフィブリルをフローセルの電極として使用すると、かかる問題が解決された。

フローセルの電極として使用される、官能化されたカーボンフィブリルはエレクトロ活性剤による表面処理によって改質されることができる。フィブリルは触媒又は電極触媒の作用をする又はフロー物質の望まない反応又は吸着を抑制する働きをする、エレクトロ活性でない材料によっても改質されることができる。

電極を通してのこれらの流れはエレクトロクロマトグラフィー、電気化学的に変調されたアフィニティークロマトグラフィー、エレクトロ合成、又は電気化学的に変調されたイオン交換クロマトグラフィーのような分離技術に有効である。それらはカーボンフィブリルマット上に捕捉された物質を分離及び／又は分析する診断装置にも使用できる。

官能化されたカーボンフィブリルとその他のファイバー又は粒状物から構成された複合マットも使用できる。これらファイバー又は粒状物はカーボンフィブリルマットの最終の気孔度又は電導度を変更するために懸濁物に添加できる。

実施例 5 2

鉄フタロシアニン官能化フィブリルの

フローセルの電極としての用途

鉄(III)フタロシアニン-ビス-ピリジン (FePc-2Py) (アルドリッチ 41, 016-0) を吸着させることによってグラファイト性フィブリルを改質した。0.403 g のフィブリルと 0.130 g の FePc-2Py を 150 ml の無水エタノールに加え、そして 450 ワット ブランソン プロープ超音波

装置で5分処理した。得られたスラリを47mmのミリポア膜真空フィルターマニホルドで0.45 μ mのMSIナイロンフィルターで濾過し、水洗し、そして真空オーブンで35℃の一晩乾燥した。最終重量は0.528gであり、それは実質的吸着を表していた。濾液の分光分析は残存するF e P c - 2 P yを説明していた。

5mgのF e P c - 2 P y修飾フィブリルを10mlの脱イオン水の中に超音波装置で分散させた。分散物を25mmの膜フィルターマニホルドの中に保持された一枚の200メッシュのステンレス鋼(SS)の網スクリーンの上に堆積させ、そ

して室温で乾燥した。SSスクリーンで支持されたフィブリルマットの直径0.5インチの円盤を、アーチパンチを使用して切り取った。

電気化学フローセルは、13mmのプラスチックの、スウィニイ(Swinney)タイプの膜フィルターホルダーから、その膜支持体の上に直径13mmの円盤の金の網(400メッシュ、Ladd Industries)を置き、そしてそのスクリーンを、3電極ポテンシオスタット回路の作業電極として外部接続のためにフィルターホルダーの壁を通して送られたテフロン(登録商標)熱収縮チューブで絶縁されている白金線と電気的に接触させることによって、構成された。金の網は外側の縁の周辺に少量のエポキシを用いてその場に固定された。金箔片をリング状に、そしてフィルターホルダーの底の下流の部分に入れ、そして3電極ポテンシオスタット回路の対向電極として接続のために絶縁された白金リード線と接続した。1MのHClの中で電気化学的に酸化された直径0.5mmの銀線のリングを、参照電極として接続のために絶縁されたリードと共にフィルターホルダーの上部に入れた。

F e P c - 2 P yで修飾されたCNの直径0.5インチの円盤をフローセルの中に入れ、それから、EG&G PAR273ポテンシオスタットの適切なリードに接続した。フローセルは、pH7.0の0.1M磷酸カリウム緩衝液中の0.1MのKClを充填したセージ(Sage)シリングポンプに接続した。20mv/秒の電圧走査速度でサイクリックボルタモグラム(CV)をノーフロー(静止)及びフロー(0.4ミル/分)のもとで記録した(図6参照)。CVはフローが有っても無くてもほぼ同じであり、そしてF e P c - 2 P yを含有する表面と矛盾

しない2つの連続した可逆の酸化と還元を示した。流体フロー条件下でのレドックスピークの持続性は、FePc-2Pyがカーボンフィブリルに強く結合していること及び鉄フタロシアニン修飾フィブリルがフロッサー電極材料として十分に作用することを実証している。

三次元構造の別の例はフィブリル-セラミック材料である。

実施例 5 3

アルミナーフィブリル組成物(185-02-01)の製造

1 gの、硝酸で酸化されたフィブリル(185-01-02)を、100 ccの脱イオン水の中にU/Sジスイントグレーダーを使用して高度に分散させた。こ

のフィブリルスラリーを90℃に加熱し、そして20 ccのプロパノールの中に溶解した0.04モルのアルミニウムトリブトキシドの溶液をゆっくり添加した。還流を4時間継続し、その後で冷却器を外してアルコールを飛ばした。30分後に冷却器を戻してスラリーを100℃で一晩還流した。一様な外観を有する黒色ゾルが得られた。このゾルを室温に冷却し、そして1週間後に、平滑な表面をもつ黒色ゲルが形成された。このゲルを空气中で300℃に12時間加熱した。

このアルミナーフィブリル複合体をSEMによって試験した。亀裂表面の顕微鏡写真はゲルの中のフィブリルの均一分散を示していた。

実施例 5 4

シリカーフィブリル組成物(173-85-03)の製造

2 gの、硝酸で酸化されたフィブリル(173-83-03)を、200 ccのエタノール中に超音波処理を使用して高度に分散させた。このスラリーに、50 ccのエタノール中に溶解した0.1モルのテトラエトキシシランの溶液を室温に加え、その後で3 ccの濃塩酸を加えた。この混合物を85℃に加熱し、そしてその温度に保って容量を100 ccまで減少させた。混合物を冷却し、そして放置して黒色固体ゲルを生成した。このゲルを空气中で300℃で加熱した。

このシリカーフィブリル複合体をSEMによって試験した。亀裂表面の顕微鏡写真はゲルの中のフィブリルの均一分散を示していた。

他のセラミック、例えば、ジルコニア、チタニア、希土類酸化物、及び三元酸

化物をもっても、類似の調製物を製造できる。

7. ポリマービーズ上へのグラファイト性ナノチューブの導入

ポリマービーズ、特に Fe_3O_4 コアを含有する磁性ポリマービーズ、例えば、ダイナル(Dynal)及びその他で製造されたもの、は診断における多数の用途を有している。しかしながら、これらのビーズはナノチューブから入手可能なものに比べて低い表面積を有することに煩わされる。官能化されたフィブリルはビーズの表面上に導入することができ、それはポリマー／フィブリル複合体を分離又は分析用途（例えば、電気化学的発光アッセイ、酵素の固定化）の固体支持体として使用することを可能にする。

実施例 5 5

官能化ビーズへの官能化フィブリルの付着

7. 5mgの磁性のトシル活性化されたダイナビーズM-450（30mg/ml）ビーズ（ダイナル、ノールウェーのオスロ在）を0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5、で3回洗浄した。それから0.9mlの0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.4、をビーズに加え、そして0.1mlのアミンフィブリルを加えた。混合物を室温で16～24時間回転させた。

顕微鏡写真で観察したとき、フィブリルの表面上にビーズを有するフィブリルのかたまりは明らかであった。

以上の説明および実施例によって例証されているように、本発明はナノチューブの広く様々な処方及びその用途における応用を有している。

使用されている用語及び表現は記述の表現として使用され、限定の表現として使用されているのではなく、またかかる用語又は表現の使用においてはその一部として示され記述されている特徴の何らかの均等物を排除することを意図しておらず、本発明の思想の範囲内で様々な変更が可能であることが認識される。

917-101 GFへのBSAの結合

上澄み中のBSAの測定 (対グラフトファイブリル)
OD 562nm, (uBSA 測定)

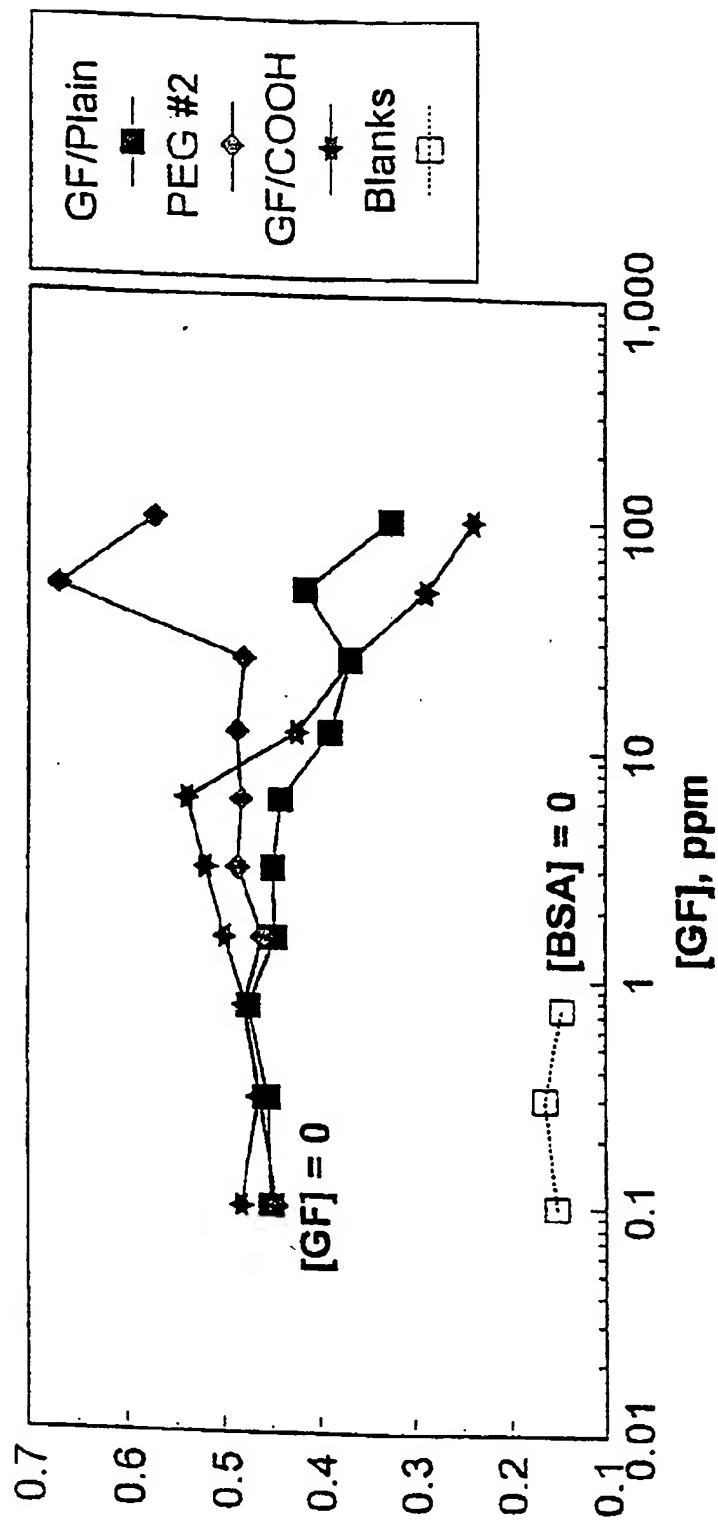


Fig. 1

917-105 GFへのβ-ラクトグロブリンの結合

【図2】

上澄み中のβ-ラクトグロブリンの測定(対GF)

OD 562nm (uBCA 測定)

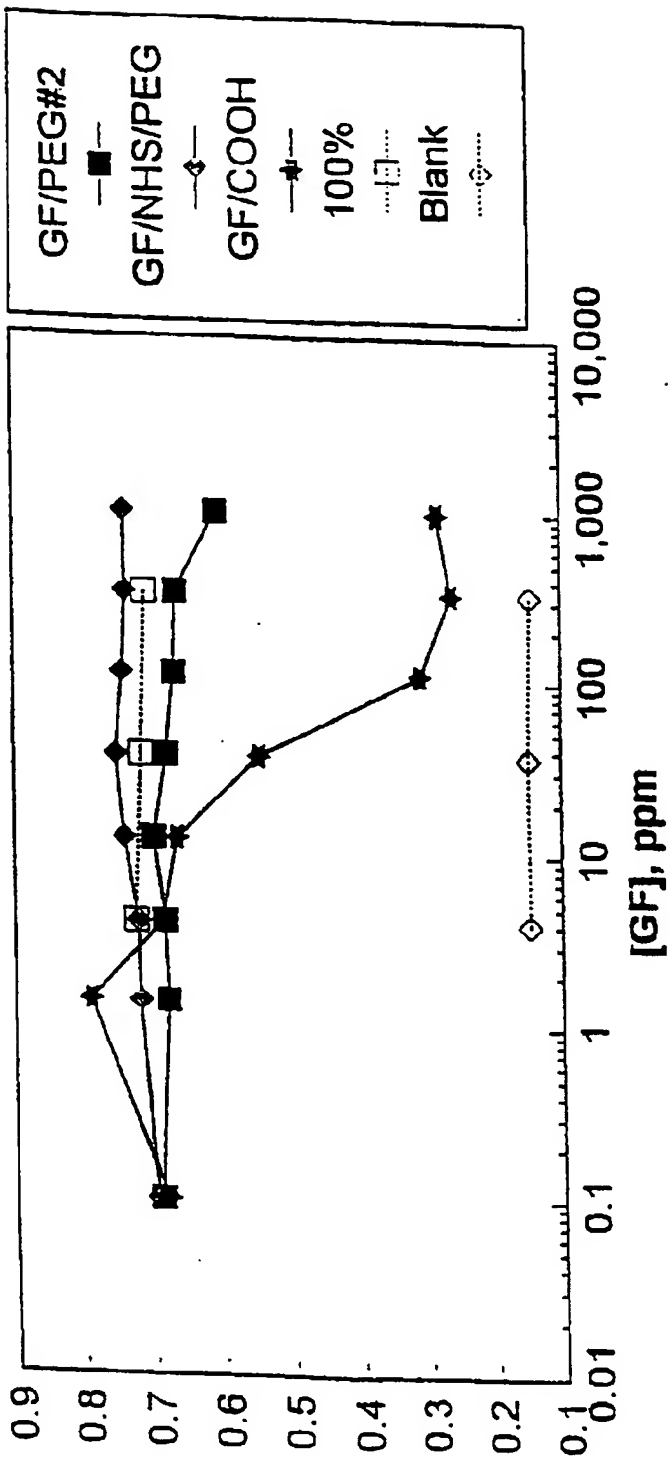


Fig. 2

第三アミンフイリカルム上でのウシ血清アルブミンの溶出プロフィール

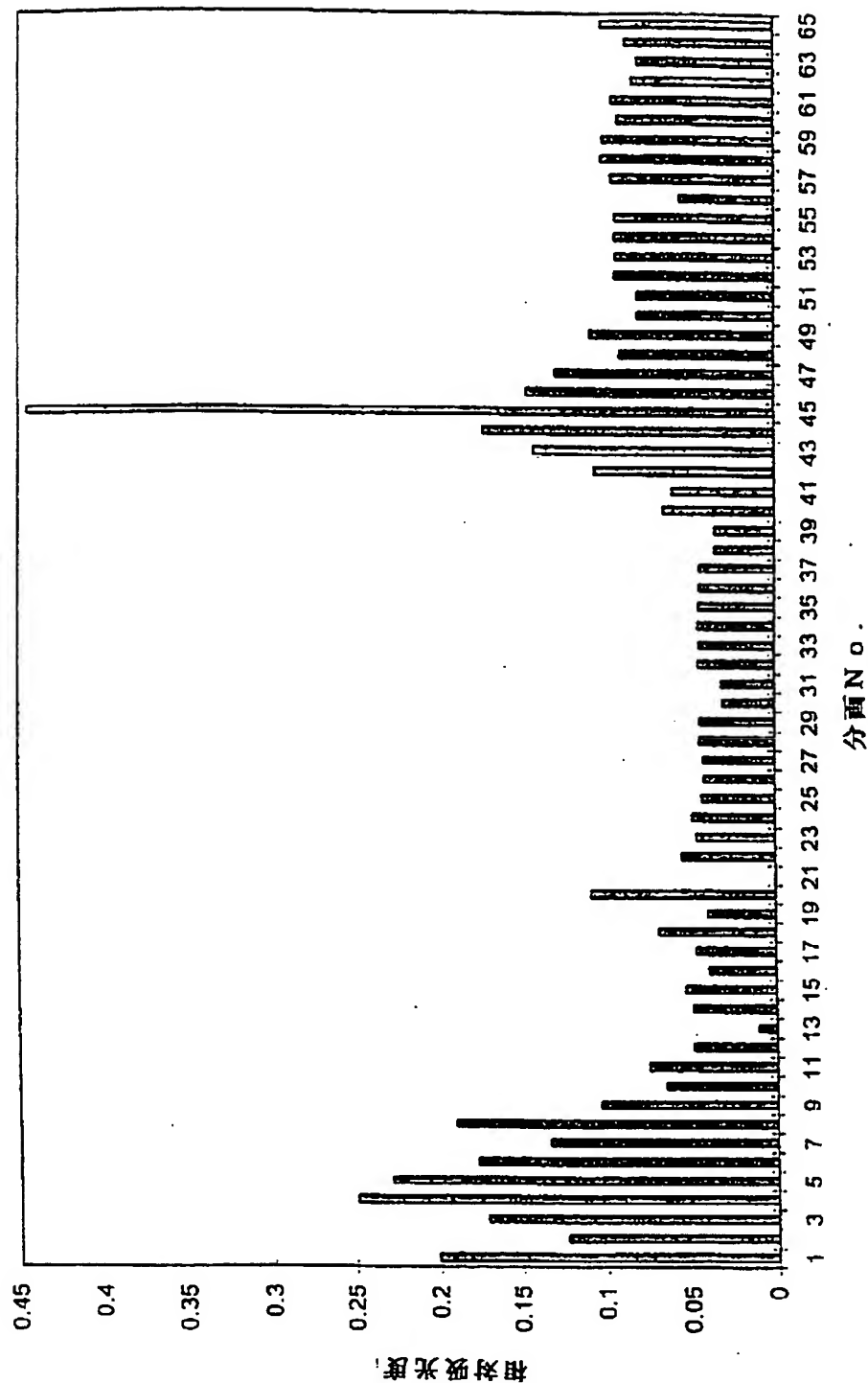


Fig. 3

【図4】

第四アミンフイルカラム上でのウシ血清アルブミンの溶出プロフィール

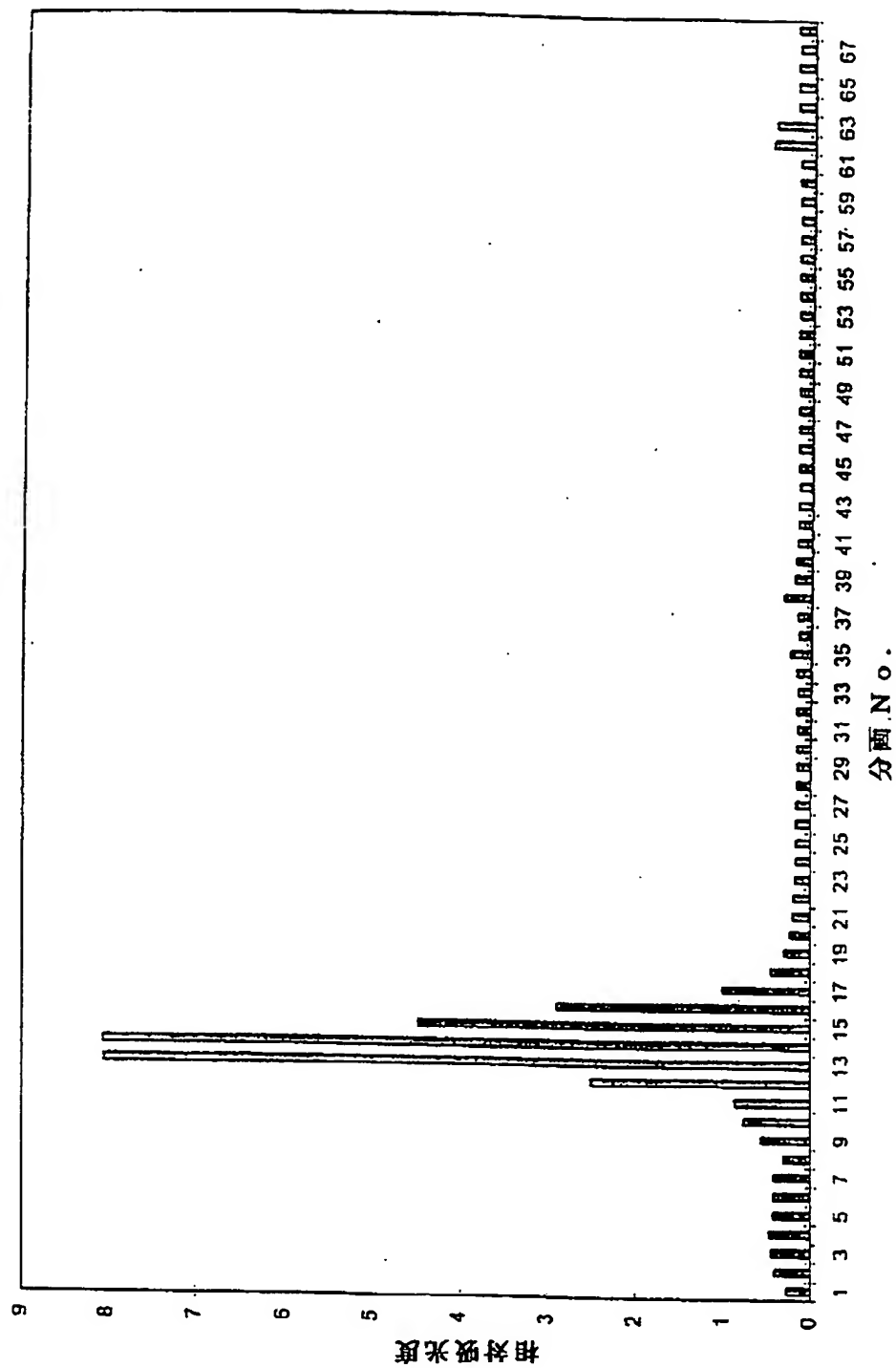


Fig. 4

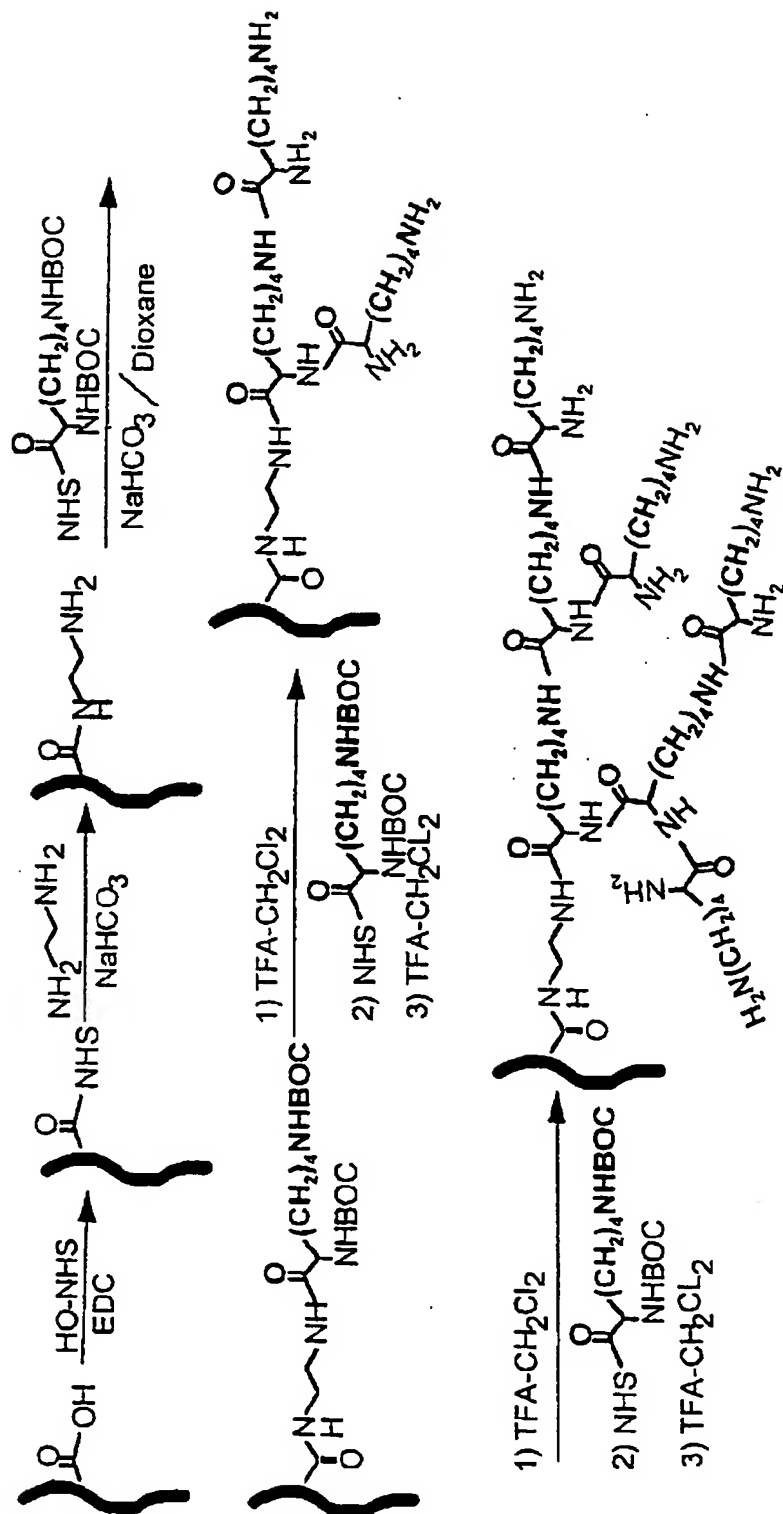


Fig. 5

フローセルにおけるFePc修飾CN電極

【図6】

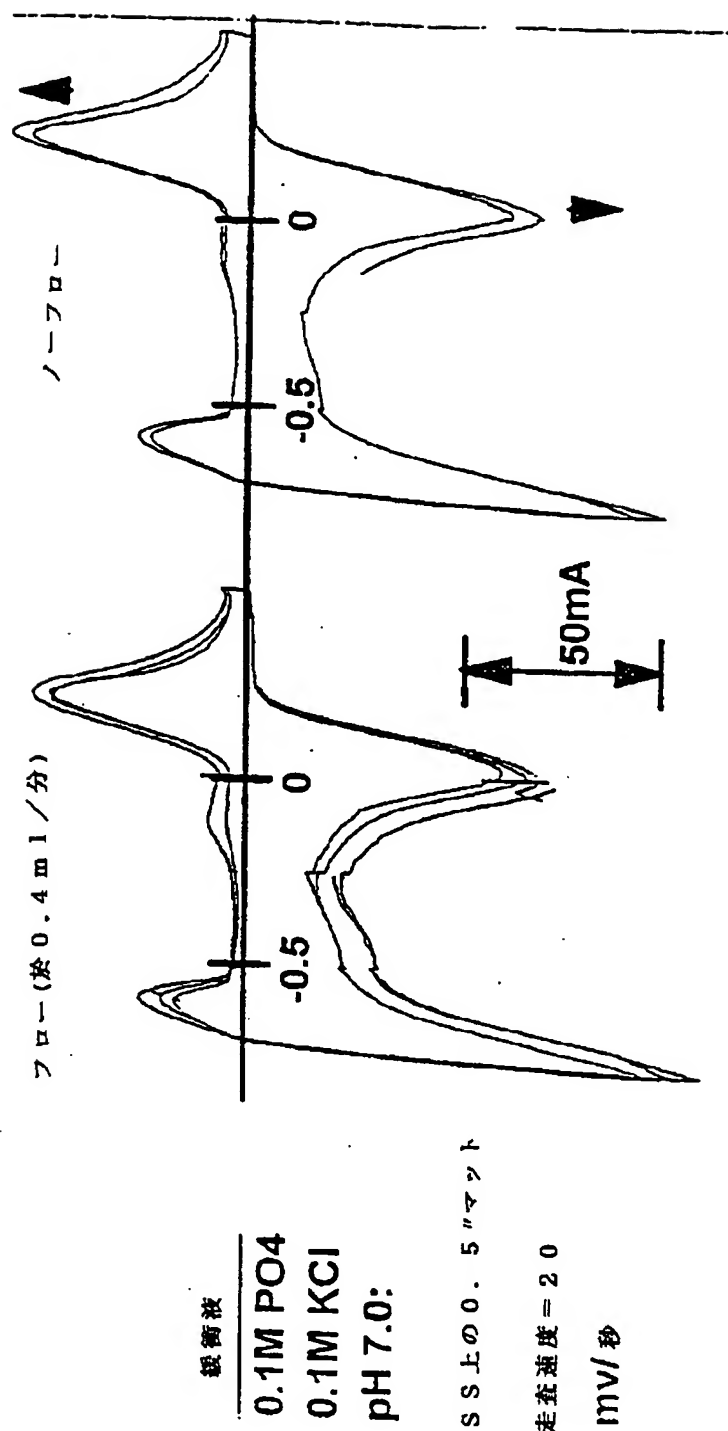


Fig. 6

【图 7】

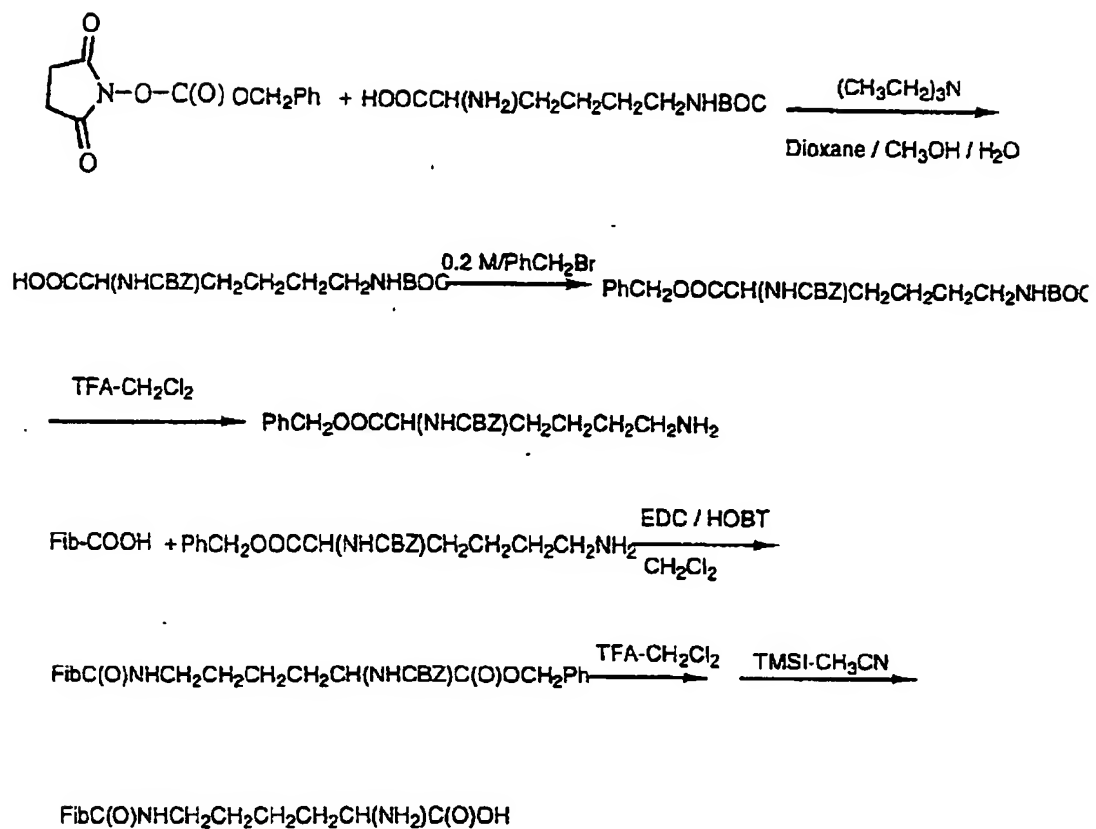


Fig. 7

フィブリーパーゼによって触媒されたエステル化

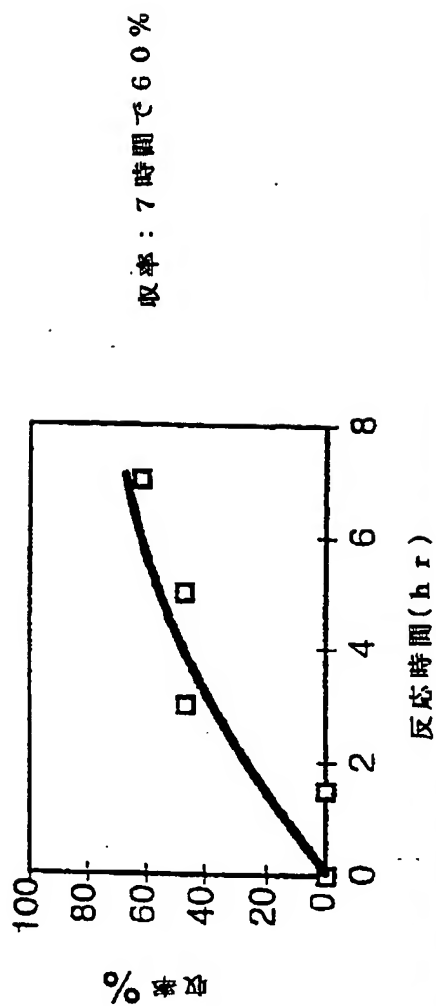
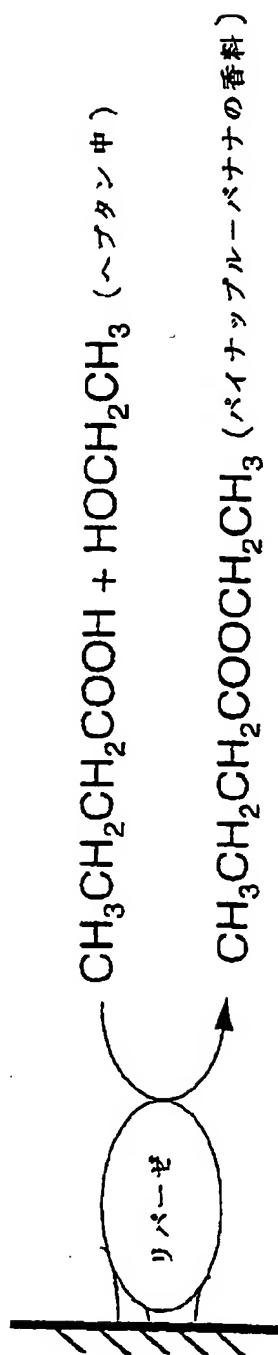


Fig. 8

【図9】

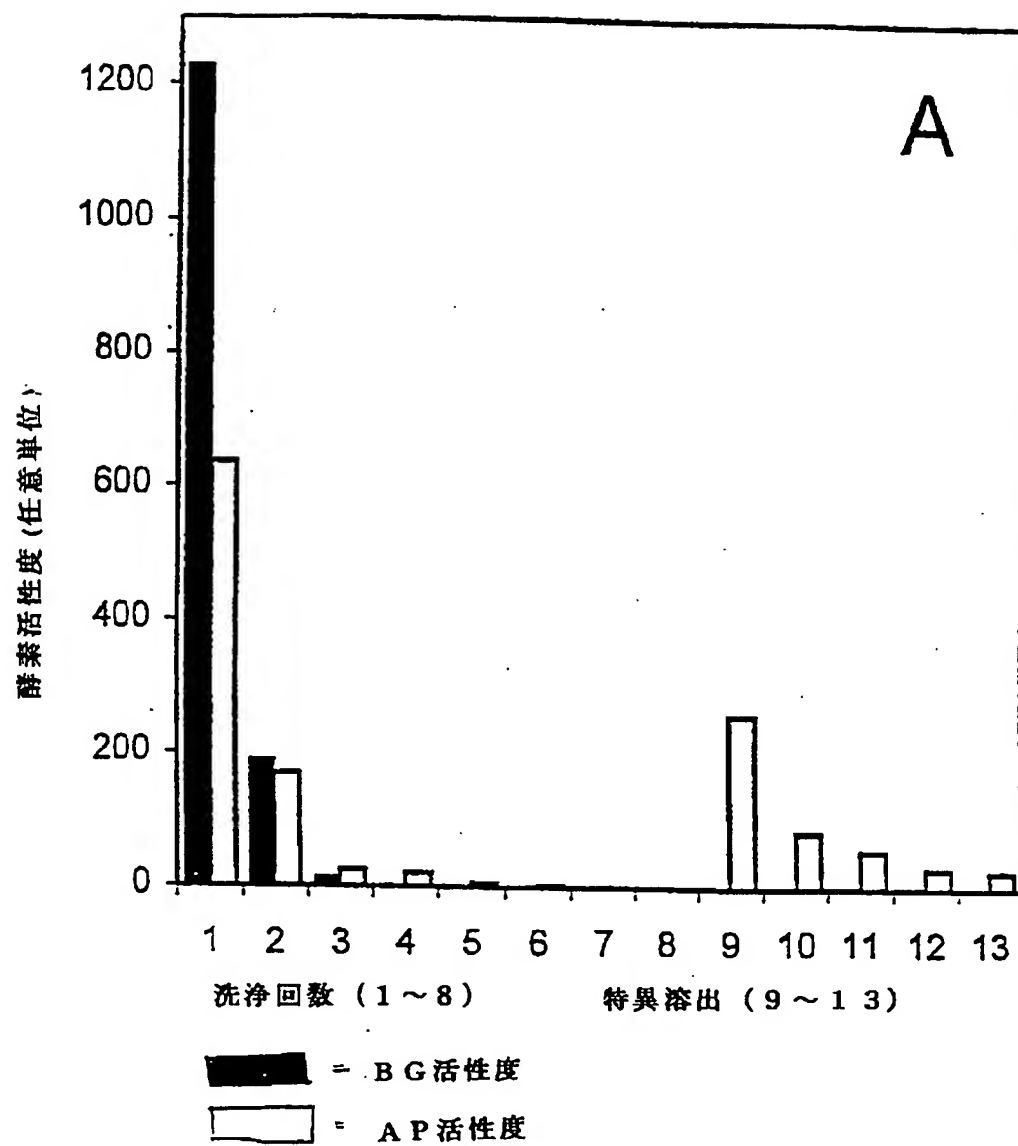


Fig. 9

【図10】

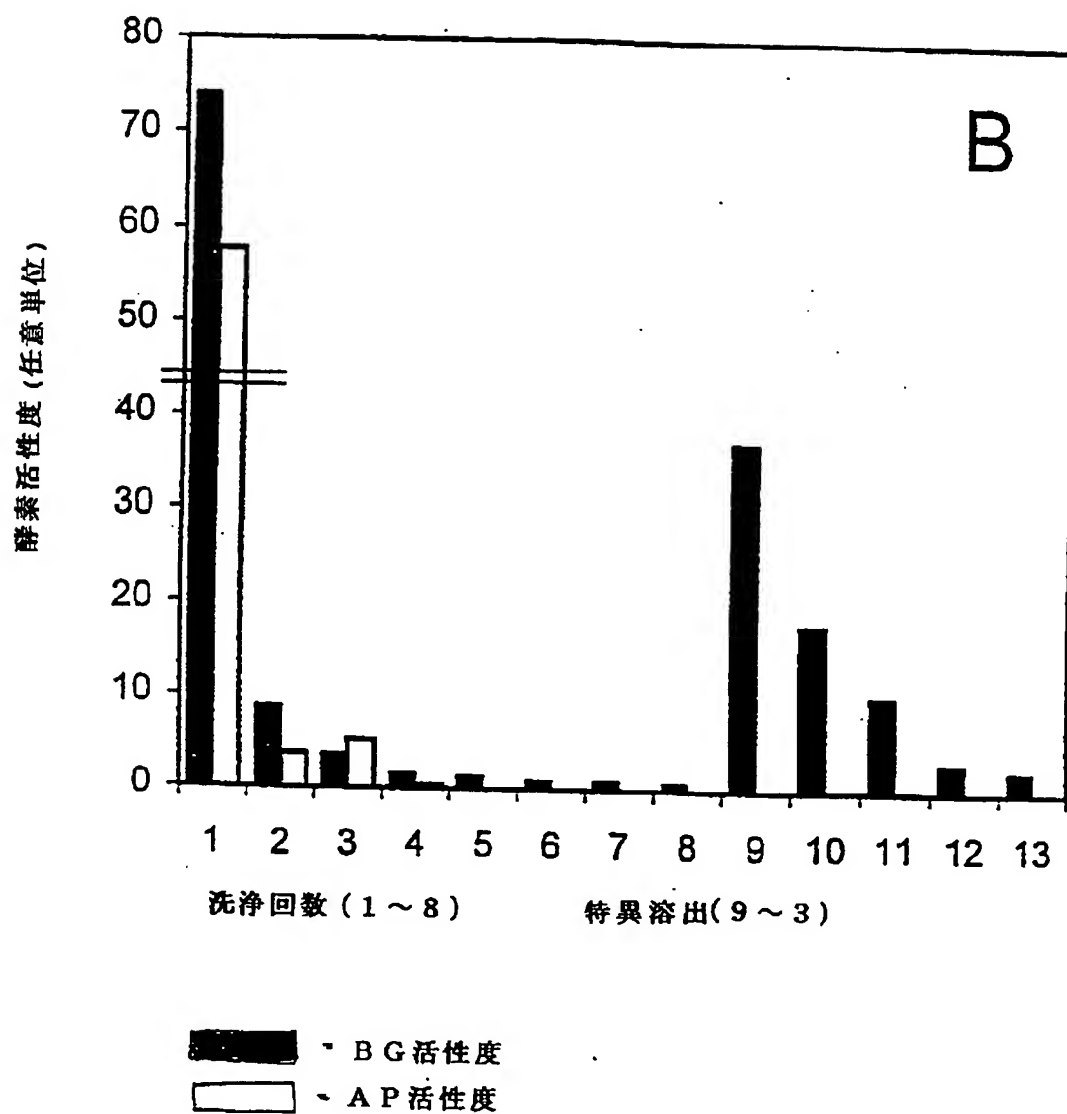


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/03553

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : A61K 9/00; A01N 25/00; C09C 1/56; B32B 5/16

US CL : 424/405, 484, 485, 486; 435/174, 177, 180; 514/772, 772.1 788.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 530/402, 810, 815, 812, 815; 935/22, 52, 54; 423/447.2, 447.3, 460; 428/376, 367, 398, 403, 408

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

NONE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,663,230 A (TENNET) 05 May 1987, see entire document.	1-64
A	US 5,346,683 A (GREEN et al) 13 September 1994, see entire document.	1-64
A	US 5,424,054 A (BETHUNE et al) 13 June 1995, see entire document.	1-64
A, P	US 5,547,748 A (RUOFF) 20 August 1996, see entire document.	1-64
A	US 5,465,587 A (FITZPATRICK-MCELLIGOTT et al) 14 November 1995, see entire document.	1-64
A	US 5,472,749 A (DRAVID et al) 05 December 1995, see entire document.	1-64

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone.
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"A" document member of the same patent family.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

26 JUNE 1997

Date of mailing of the international search report

18 JUL 1997

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

THURMAN K. PAGE

Telephone No. (703) 308-2351

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US97/03553

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A · P	US 5,482,601 A (OHSHIMA et al) 09 January 1996, see entire document.	1-64

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード' (参考)
C 0 7 C	51/353	C 0 7 C	51/353
	57/40		57/40
	57/72		57/72
	63/44		63/44
	209/00		209/00
	211/57		211/57
	233/65		233/65
	319/14		319/14
C 0 7 D	487/22	C 0 7 D	487/22
C 0 7 F	1/02	C 0 7 F	1/02
	5/00		5/00
	7/08		7/08
C 0 7 K	17/08	C 0 7 K	17/08
C 0 8 J	3/12	C 0 8 J	3/12
G 0 1 N	27/30	G 0 1 N	27/30
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S D, SZ, UG), AM, AT, AU, BA, BB, B G, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, L K, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, U S, UZ, VN, YU		
(72)発明者	モイ, デビッド アメリカ合衆国01890 マサチューセッツ 州ウインチェスター, エドワード ドライ ブ 21		
(72)発明者	ルー, ミン アメリカ合衆国20706 メリーランド州ラ ンハム, ダールグリーン コート 6411		
(72)発明者	マーチン, マーク アメリカ合衆国20852 メリーランド州エ ヌ, ベセスダ, オールド ファーム コー ト 6516		
(72)発明者	ニウ, チュン, ミン アメリカ合衆国02144 マサチューセッツ 州サマビル, コンウエル アベニュー 104		
(72)発明者	オガタ, ナオヤ 東京都千代田区紀尾井町7-1 上智大学 化学部内		

- (72)発明者 テネント, ハワード
アメリカ合衆国19348 ペンシルバニア州
ケネット スクウェア, チャンドラー ミ
ル ロード 301
- (72)発明者 ドン, リウエン
アメリカ合衆国20850 メリーランド州ロ
ックビル, ポトマック オークス ドライ
ブ 11411
- (72)発明者 スン, ジー
アメリカ合衆国20854 メリーランド州ポ
トマック, ヘイワース ドライブ 13504
- (72)発明者 ヘルムズ, ラーリイ
アメリカ合衆国20874 メリーランド州ジ
ャーマンタウン, コッテイジ ガーデン
ドライブ 18036, アパートメント 103
- (72)発明者 ジャメイソン, ファビアン
アメリカ合衆国20879 メリーランド州ガ
イザーズバーグ, ウォーカーズ チョイス
ロード 18810, ナンバー 4
- (72)発明者 リアン, パム
アメリカ合衆国91801 カリフォルニア州
アルハムブラ, マルガリータ アベニュー
123, アパートメント シー
- (72)発明者 シンプソン, デビッド
アメリカ合衆国20852 メリーランド州エ
ヌ. ベセスダ, サルキイ レーン 611